

Karl-Heinrich Schmidt

BEITRÄGE ZUR SYNTHESE HETERODETER
CYCLOPEPTIDE MIT THIOÄTHER-BINDUNG
UND ZUR SYNTHESE DES TRYPTATHIONINS

Frankfurt am Main 1965

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546413_0017

BEITRÄGE ZUR SYNTHESE HETERODETER CYCLOPEPTIDE
MIT THIOÄTHER-BINDUNG
UND ZUR SYNTHESE DES TRYPTATHIONINS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main
vorgelegt von
Karl-Heinrich S c h m i d t

Frankfurt am Main

1963

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main



Dekan: Prof. Dr. W. FRANZ
Berichterstatter: Prof. Dr. TH. WIELAND
Prof. Dr. G. PFLEIDERER
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 1964
Tag der Promotion: 24. Februar 1964

Die vorliegende Arbeit wurde unter der
Anleitung von
Herrn Professor Dr. THEODOR WIELAND
in der Zeit von Juni 1960 bis September 1963
im Institut für Organische Chemie an der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. THEODOR WIELAND,
danke ich für die Überlassung des Themas
dieser Arbeit sowie für die wertvolle
Förderung und Unterstützung, die er mir
zuteil werden liess.

MEINER MUTTER

in Dankbarkeit

gewidmet

I N H A L T

=====

Seite

1	E I N L E I T U N G	1
2	T H E O R E T I S C H E R T E I L	7
2.1	Versuche zur Synthese des cyclo-(L-Alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfides	7
2.11	Synthese des tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylesters	9
2.12	Synthese des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfides	14
2.13	Darstellung aktiver Ester des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfides und Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe	17
2.14	Versuche mit N-Hydroxyphthalimideestern	19

- 2.2 Synthese des Pentapeptides S-Benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alanin und Versuche zu seiner Cyclisierung 20
- 2.3 Synthese des cyclo-(L-Alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfides 24
- 2.31 Synthese des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfides aus tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester und N-Carbobenzoxy-L-cystein 27
- 2.32 Synthese des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfides aus tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolin und (L-Tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfid 29

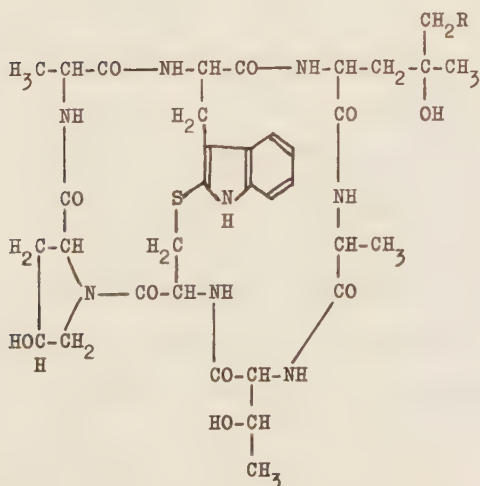
2.33	Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe und Cyclisierung	30
2.4	Synthese des Tryptathionins	32
2.41	Versuche mit N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein ...	33
2.42	Versuche mit N-Trifluoracetyl-L-cystein	34
2.43	Darstellung des Tryptathionins aus (L-Tryptophanme- thylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))- sulfid	35
2.5	Versuche zur Synthese von Tryptathionin und Trypta- thionin-Derivaten aus verschiedenen Komponenten nach der N-Chlorsuccinimid-Methode	39
2.6	Versuche zur Synthese von Tryptathionin und Trypta- thionin-Derivaten aus verschiedenen Komponenten nach der Dirhodan-Methode	43

3	EXPERIMENTELLER TEIL	46
---	----------------------------	----

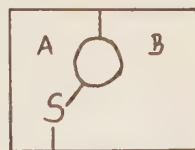
Literaturverzeichnis	91
----------------------------	----

E I N L E I T U N G

Zu den Giftstoffen des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) gehören das Phalloidin und das Phalloin. Die ersten Beiträge zur Kenntnis der giftigen Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes lieferten H. A. RAAB und J. RENZ ab 1932 (1, 2, 3). F. LYNEN und U. WIELAND gelang 1938 die Isolierung des kristallisierten Phalloidins (4). Die Konstitutionsaufklärung wurde von H. WIELAND und B. WITKOP begonnen (5) und von TH. WIELAND und Mitarbeitern abgeschlossen (6, 7, 8). Das Phalloin wurde 1957 von TH. WIELAND und K. MANNES isoliert (9). Die Ermittlung seiner Struktur wurde im Arbeitskreis von TH. WIELAND durchgeführt (10, 7, 8). Danach haben die beiden sich in ihrem Aufbau nur wenig unterscheidenden Gifte die folgende Konstitution:



abgekürzt:

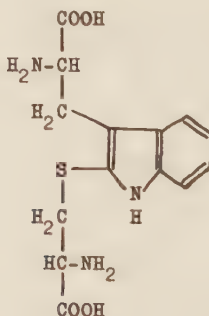


Phalloidin Ia : R = OH

Phalloin Ib : R = H

Es liegen also cyclische Heptapeptide vor, die als besonderes Strukturmerkmal eine Schwefelbrücke enthalten, durch die das Molekül in die zwei Ringe A und B unterteilt wird. Diese Thioäther-Gruppierung am Indolring des Tryptophans verursacht das charakteristische UV-Spektrum mit seinem Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 292 nm (siehe Seite 38). Die Moleküle der beiden Gifte sind aufgebaut aus den Aminosäuren L-Alanin, das zweimal enthalten ist, D-Threonin, L-Cystein, L-allo-Hydroxyprolin, L-2-Hydroxytryptophan und L-erythro- γ,δ -Dihydroxyleucin (Ia) beziehungsweise L-erythro- γ -Hydroxyleucin (Ib). Die Schwefelbrücke entsteht formal durch Abspaltung von Wasser zwischen der Sulfhydrylgruppe des L-Cysteins und der Hydroxygruppe des L-2-Hydroxytryptophans. Anstelle dieser beiden Aminosäuren kann man aber auch die Diaminodicarbonsäure II als Baustein auffassen (11).

II



Sie wird Tryptathionin genannt (12). Dieses L-Tryptophyl-(ind-2)-L-alanyl-(β)-sulfid kann formal durch oxydative Kondensation aus L-Cystein und L-Tryptophan entstehen. Es lässt sich nicht aus den Giftstoffen isolieren, da aus ihm bei der sauren Hydrolyse L-Cystein und L-2-Hydroxytryptophan entstehen.

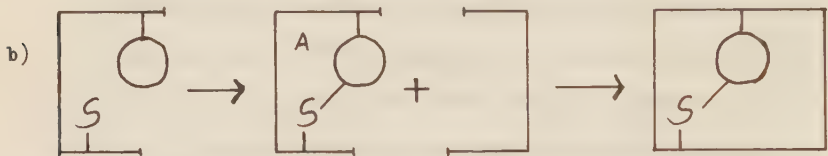
Die Synthese des Phalloins wurde von TH. WIELAND und Mitarbeitern in Angriff genommen. Zunächst wurden Phalloin-ähnliche Cyclopeptide synthetisiert, in denen die Aminosäuren des Naturstoffes teilweise durch leichter zugängliche, ähnliche Aminosäuren ersetzt wurden. So wurden L-Prolin und L-Hydroxyprolin anstatt L-allo-Hydroxyprolin, L-Isoleucin und L-Leucin anstatt L-erythro- γ -Hydroxy-leucin und zunächst auch L-Threonin anstelle der D-Form verwendet.

Eine besondere Aufgabe bei der Synthese ist die Verknüpfung der Sulfhydrylgruppe des L-Cysteins mit dem Indolring des L-Tryptophans in der 2-Stellung, die sogenannte Thioäthersynthese. Sie gelingt mit dem Sulfenylchlorid des L-Cysteins unter Abspaltung von Chlorwasserstoff. Wegen der Gefahr einer Chlorierung des Indolringes kann die Darstellung des Sulfenylchlorides nur in Abwesenheit von L-Tryptophan erfolgen. Dadurch scheiden alle Wege der Synthese aus, bei denen an einem cyclischen Heptapeptid die Thioäthersynthese als letzter

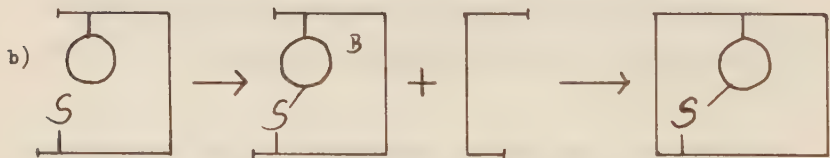
Schritt erfolgt (Weg a):



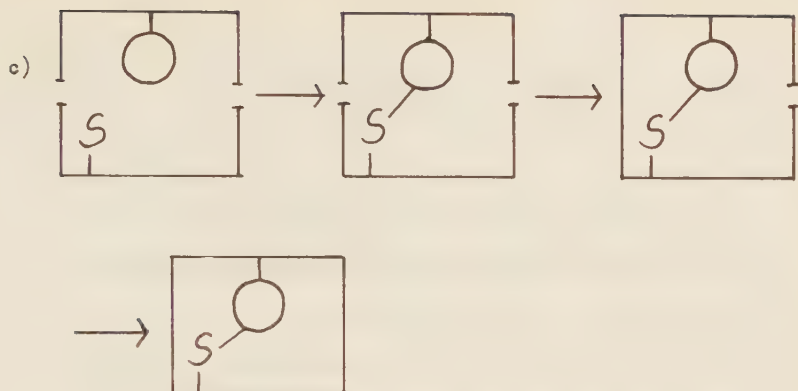
oder durch die Thioäthersynthese als Cyclisierungsreaktion der heterodete Peptidocyclus A oder B erreicht wird, an den dann der Rest des Moleküles angebaut werden könnte (Weg b):



oder

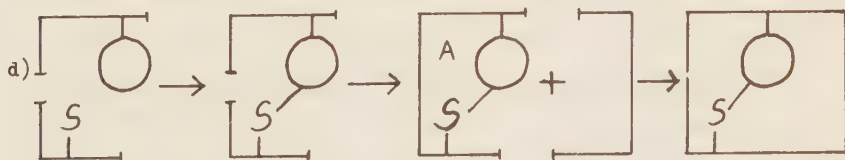


Der Aufbau eines Phalloin-ähnlichen Cyclopeptides muss also in der Weise erfolgen, dass die zur Thioäthersynthese eingesetzten Komponenten L-Cystein und L-Tryptophan getrennt enthalten. Hierbei kann aus geeignet geschützten Peptiden ein Thioäther aufgebaut werden, der bereits alle sieben Aminosäuren enthält und an dem dann die beiden Cyclisierungen durchgeführt werden (Weg c):

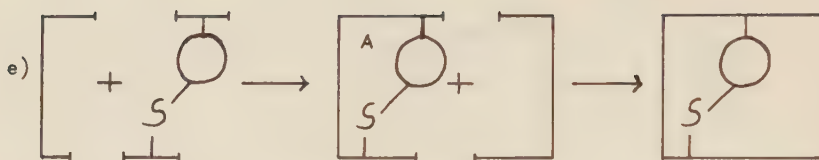


Dieser Weg wurde von K. FRETER, E. GROSS, G. SCHUPFNER und R. SARGES zur Synthese Phalloin-ähnlicher Cyclopeptide eingeschlagen (12, 13, 14).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Synthese eines Thioäthers, der die Bausteine eines der beiden Ringe A oder B enthält. Nach der Cyclisierung zum heterodeten Peptidocyclus A oder B wird der zweite Ring angefügt (Weg d):



An Tryptathionin, das in geeigneter Weise an seinen funktionellen Gruppen geschützt ist, lassen sich ebenfalls die Ringe A und B mit entsprechenden Peptiden angliedern (Weg e):



Bei der Synthese des Phalloins und Phalloidins muss berücksichtigt werden, dass die Peptidbindung an der Carboxylgruppe des Leucin-derivates wegen der Neigung zur Lactonbildung labil ist. Es ist daher der Weg vorzuziehen, bei dem der letzte Schritt der Synthese die Cyclisierung an dieser Stelle des Moleküles ist.

In der vorliegenden Arbeit werden Versuche geschildert, auf den Wegen d) und e) den heterodeten Peptidcyclus A aufzubauen.

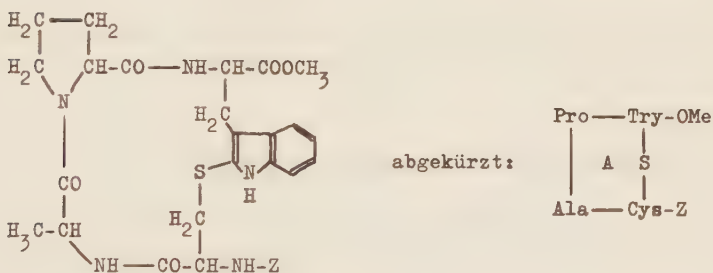
Verbunden mit Untersuchungen über die günstigsten Bedingungen und die am vorteilhaftesten verwendeten Komponenten für die Thioäthersynthese wird die Synthese des Tryptathionins beschrieben.

2

THEORETISCHER TEIL

=====

2.1 Versuche zur Synthese des cyclo-(L-Alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(8))-sulfides (III)



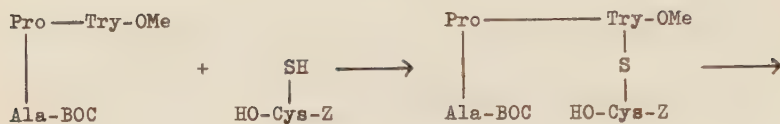
III

Z = Carbobenzoxy

Bei Beginn dieser Arbeit lag die neue Untersuchung über die Aminosäuresequenz des Phalloidins und Phalloins von TH. WIELAND und H. W. SCHNABEL (8) noch nicht vor. Der Aufbau des Ringes A wurde daher mit der von TH. WIELAND und W. SCHÖN (6) angegebenen Sequenz durchgeführt, bei der die Positionen von L-allo-Hydroxyprolin und L-Alanin vertauscht sind. Anstatt L-allo-Hydroxyprolin wurde L-Prolin verwendet.

Die Synthese von III wurde nach folgendem Schema geplant:

S c h e m a 1



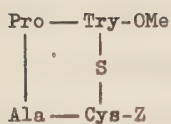
IV

V



VI

VII



III

BOC = tert.-Butyloxycarbonyl

X = p-NO₂-C₆H₄-O- (VIa, VIIa)

oder C₆H₅-S- (VIb, VIIb)

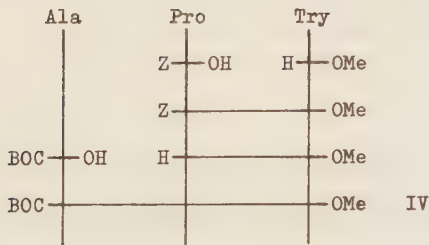
Dieses Schema entspricht dem oben angeführten Weg d).

Der aus dem geschützten Tripeptid IV und N-Carbobenzoxy-L-cystein dargestellte Thioäther V sollte über seine aktiven Ester nach Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe zu der Verbindung III cyclisiert werden.

2.11 Synthese des tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylesters (IV)

Für die Synthese des geschützten Tripeptides IV war der schrittweise Aufbau vom Carboxylende ausgehend nach der Methode der gemischten Anhydride (15a-c) gemäss Schema 2 vorgesehen.

S c h e m a 2



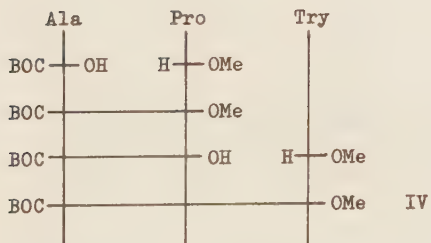
Da die Aminogruppe des L-Alanins in einer Verbindung freigelegt werden sollte (Substanz VI in Schema 1), die auch den Carbobenzoxy-Rest enthält, musste für den Schutz der Aminogruppe des Tripeptides IV eine Gruppe gewählt werden, die sich bei gleichzeitiger Anwesenheit des Carbobenzoxy-Restes unter solchen Bedingungen entfernen lässt, bei denen dieser nicht abgespalten wird. Die Wahl fiel auf den tert.-Butyloxycarbonyl-Rest, der von F. C. McKAY und N. F. ALBERTSON (16) sowie von G. W. ANDERSON und A. C. MCGREGOR (17) in die Peptidchemie eingeführt wurde. Diese Schutzgruppe wird in steigendem Ausmasse zur Acylierung von Aminogruppen verwendet, seitdem R. SCHWYZER und Mitarbeiter (18) als Reagenz das von L. A. CARPINO und Mitarbeitern (19) dargestellte tert.-Butyloxycarbonylazid empfohlen haben. Zur Abspaltung, die mit Säuren leicht gelingt, hat sich die Trifluoressigsäure am besten bewährt (20). Das tert.-Butyloxycarbonylazid wird aus Chlorameisensäurephenylester über den tert.-Butyl-phenyl-kohlensäureester und das tert.-Butyloxycarbonylhydrazid dargestellt (21a, b).

Aus L-Tryptophanmethylester-hydrochlorid und Carbobenzoxy-L-prolin wurde nach der Anhydrid-Methode das geschützte Dipeptid in kristallisierter Form gewonnen. Da bei der Darstellung des L-Tryptophanmethylester-hydrochlorides mit Methanol und Chlorwasserstoff violett gefärbte Nebenprodukte auf-

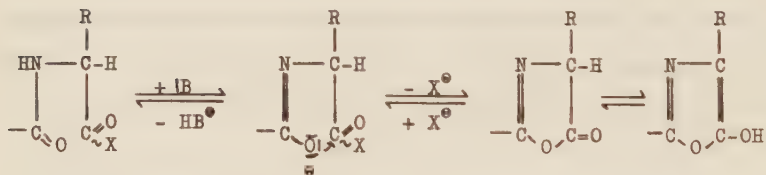
traten, wurde auch das neue von M. BRENNER und W. HUBER (22) angegebene Verfahren zur Veresterung von Aminosäuren mit Methanol und Thionylchlorid angewendet. Bei der Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppe an diesem Tryptophan-Dipeptidderivat traten erhebliche Schwierigkeiten auf. Nach der katalytischen Hydrogenolyse in methanolischer Salzsäure wurde ein rotbrauner öliges Rückstand erhalten, der nicht zu kristallisieren war. Die katalytische Hydrogenolyse in Eisessig verlief nur äusserst langsam. Mit einer 1 n Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig gelang ebenfalls keine saubere Abspaltung.

Daher wurde für das geschützte Tripeptid IV folgender Syntheseweg geplant:

S c h e m a 3



Zur Knüpfung der Peptidbindungen sollte wieder das Verfahren über die gemischten Anhydride dienen. Dieser Weg sieht einen Peptidaufbau von der amino-endständigen Aminosäure ausgehend vor. In dem vorliegenden Falle ist dieser Weg ohne Gefahr einer Racemisierung gangbar, da an der Iminosäure Prolin wegen des Fehlens von Wasserstoff an der Iminogruppe im tert.-Butyl-oxycarbonyl-dipeptid keine Racemisierung nach der Aktivierung der Carboxylgruppe durch Anhydridbildung möglich ist. Bei aktivierten Acyl-dipeptiden ist eine durch Basen katalysierte Racemisierung nach folgendem Mechanismus möglich (23):



Racemisierung

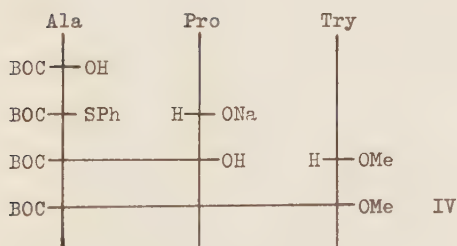
X = aktivierende Gruppe

Die Racemisierung kommt über ein Oxazolinon zustande, das sich nicht bilden kann, wenn das in ihm enthaltene Stickstoffatom zu Prolin gehört.

Mit der Anhydrid-Methode wurde aus tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin und L-Prolinmethylester-hydrochlorid ein nicht kristallisierbares öliges Dipeptidderivat erhalten. Die alkalische Verseifung zum tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolin verlief nur mit schlechter Ausbeute, da dabei auch die Peptidbindung gespalten wurde. Nach der Kristallisation des tert.-Butyloxycarbonyl-dipeptides konnten in der Mutterlauge tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin und L-Prolinmethylester elektrophoretisch nachgewiesen werden.

Die Synthese des geschützten Tripeptides IV erfolgte daher nach dem folgenden Schema:

S c h e m a 4



Der tert.-Butyloxycarbonyl-L-alaninthiophenylester wurde nach der Anhydrid-Methode dargestellt (24). Die Umsetzung

mit dem Natriumsalz des L-Prolins ergab kristallines tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolin, das mit L-Tryptophanmethylester-hydrochlorid nach der Anhydrid-Methode das gewünschte Tripeptidderivat IV lieferte. Dieses konnte nur amorph erhalten werden, war aber chromatographisch rein.

2.12 Synthese des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(S))-sulfides (V)

Die Darstellung schwefelhaltiger Indolderivate gelang TH. WIELAND und Mitarbeitern (25, 26). Die Schwefel-Funktion wurde mit Dischwefeldichlorid und aliphatischen Sulfensäurechloriden in einem indifferenten Lösungsmittel bei 0° in die 2-Stellung des Indolringes eingeführt. Mit Dischwefeldichlorid entstehen dabei zunächst Disulfide, die durch Reduktion gespalten werden können. Die erhaltenen Verbindungen besitzen das für Phalloidin und Phalloin charakteristische UV-Spektrum. TH. WIELAND, K. FRETER und E. GROSS konnten diese Thioäthersynthese auf Derivate des Cysteins und Tryptophans übertragen (12). Die sehr empfindlichen Sulfenylchloride der Cysteinderivate wurden durch Einwirkung von N-Chlorsuccinimid (27) in Benzol und Chloroform bei 0° unter Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff dargestellt.

Andere Methoden der Chlorierung waren zu durchgreifend. Die Thioäthersynthese besteht in einem elektrophilen Angriff des Sulfensäurechlorides an der 2-Stellung des Indolringes unter Abspaltung von Chlorwasserstoff.

Das zu der Darstellung des Thioäthers V neben dem geschützten Tripeptid IV benötigte N-Carbobenzoxy-L-cystein wurde zunächst durch Umlagerung des S-Carbobenzoxy-L-cysteins gewonnen. Solche S-N-Acylwanderungen benutzten TH. WIELAND und Mitarbeiter zur Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten (28). Die Umlagerung des S-Carbobenzoxy-L-cysteins wurde in Tetrahydrofuran und Wasser mit einer äquivalenten Menge Triäthylamin in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Nach der Aufarbeitung bei möglichst weitgehendem Luftausschluss fiel das N-Carbobenzoxy-L-cystein ölig an, war aber elektrophoretisch rein und enthielt kein N,N'-Dicarbobenzoxy-L-cystin. Dieses Öl wurde zur Thioäthersynthese verwendet, die damit erfolgreich verlief.

Um die etwas mühevollen Aufarbeitung des N-Carbobenzoxy-L-cysteins unter Luftausschluss zu vermeiden, wurde der Versuch gemacht, das in Chloroform suspendierte S-Carbobenzoxy-L-cystein umzulagern. Hierin ist N-Carbobenzoxy-L-cystein löslich. Während die S-N-Acylwanderung in Tetrahydrofuran

und Wasser nach 5 Stunden nahezu quantitativ verlaufen war, zeigte das Elektropherogramm des Ansatzes nach 40 Stunden noch grössere Mengen S-Carbobenzoxyl-L-cystein. Die filtrierte Lösung wurde zur Bildung des Sulfenylchlorides verwendet, die Thioäthersynthese verlief jedoch ohne Ergebnis. Bei Zugabe der Tryptophan-Komponente trat die sonst beobachtete rote Färbung der Lösung nicht auf. Dies überraschte zunächst nicht; denn sie ist auf einen Angriff des freigesetzten Chlorwasserstoffes am Indolring zurückzuführen, der in Gegenwart des Triäthylamins durch Bildung von Triäthylammoniumchlorid verhindert werden sollte. Offenbar stört aber die Base bereits in undurchsichtiger Weise die Bildung des Sulfenylchlorides.

Das benötigte N-Carbobenzoxyl-L-cystein wurde ferner durch reduktive Spaltung des N,N'-Dicarbobenzoxyl-L-cystins mit Wasserstoff in statu nascendi hergestellt. Bei der Einführung der Schutzgruppe in das L-Cystin müssen die von M. BERGMANN und L. ZERVAS (29) angegebenen grossen Überschüsse an Carbobenzoxylchlorid und Natronlauge verwendet werden, da mit äquivalenten Mengen auch Monocarbobenzoxyl-L-cystin in grösserer Menge gebildet wird.

In mehreren Ansätzen wurde die Thioäthersynthese mit dem Tripeptidderivat IV und N-Carbobenzoxyl-L-cystein im Mol-

verhältnis 1 : 2 durchgeführt. Es ist günstig, nicht mehr als 4 mMol N-Carbobenzoxyl-L-cystein und 2 mMol des Tripeptidderivates pro Ansatz zu verwenden, da bei grösseren Ansätzen die Ausbeute sinkt. Dies ist auf die Unbeständigkeit des Sulfonylchlorides zurückzuführen, das sich bereits zu zersetzen beginnt, während noch N-Carbobenzoxyl-L-cystein mit dem N-Chlorsuccinimid zur Reaktion gebracht wird. Ferner besteht gegen Ende der Reaktion die verstärkte Gefahr einer Bildung von N,N'-Dicarbobenzoxyl-L-cystin aus dem in grösserer Menge vorliegenden Sulfonylchlorid und dem hinzukommenden Cysteinderivat.

Der Thioäther V wurde aus dem Rohprodukt durch präparative Papierelektrophorese abgetrennt. Eine Extraktion mit Kaliumhydrogencarbonatlösung genügte zu seiner Gewinnung nicht, weil auch das entstandene N,N'-Dicarbobenzoxyl-L-cystin mit ausgeschüttelt wurde.

2.13 Darstellung aktiver Ester des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxyl-L-alanyl-(β))-sulfides (V) und Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe

Die Cyclisierung des Thioäthers V zum Ring A des Phalloin-Modells III sollte über aktive Ester vorgenommen werden.

Nach dieser Methode waren bereits cyclische Peptide dargestellt worden. R. SCHWYZER und P. SIEBER verwendeten den p-Nitrophenylester zur Synthese des Gramacidin S (30). TH. WIELAND und B. HEINKE cyclisierten ein Hexapeptid über dessen Thiophenylester (23).

Die freie Carboxylgruppe des Thioäthers V wurde sowohl mit p-Nitrophenol als auch mit Thiophenol aktiviert. Die Darstellung der aktiven Ester erfolgte mit Dicyclohexylcarbodiimid (31). Sie konnten als elektrophoretisch einheitliche Substanzen gewonnen werden, die jedoch schwach braun gefärbt waren. Der p-Nitrophenylester VIa konnte nur in schmieriger Form gewonnen werden, während der Thiophenylester VIb flockig anfiel.

Die anschliessende Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe an VIa und VIb mit Trifluoressigsäure führte nicht zu einheitlichen Produkten. Im Elektropherogramm bei pH 1,9 waren neben den gewünschten Reaktionsprodukten VIIa und VIIb noch zwei weitere zur Kathode wandernde Substanzen nachzuweisen. Durch präparative Papierelektrophorese bei pH 1,9 wurden die Nebenprodukte abgetrennt. Das Hauptprodukt VIIa bzw. VIIb wurde mit Isopropanol aus den Papierstreifen eluiert. Die aus den Eluaten gewonnenen Substanzen zeigten im Elektropherogramm überraschenderweise eine sowohl

bei pH 6,5 als auch bei pH 1,9 nicht wandernde Verbindung, die mit Ninhydrin keine Farbreaktion ergab, wie es für den cyclischen Thioäther III zu erwarten war. Die für Thioäther charakteristische Farbreaktion verlief jedoch negativ. Mit Zimtaldehyd trat in einer Atmosphäre von Chlorwasserstoff anstatt der erwarteten blauen eine braune Farbe auf, wie sie für Indolderivate mit freier 2-Stellung typisch ist. Zu entsprechenden Befunden kam auch R. SARGES bei seinen Bemühungen, über aktive Ester einen Thioäther nach Abspaltung des tert.-Butyloxycarbonyl-Restes zu cyclisieren (32).

2.14 Versuche mit N-Hydroxyphthalimidestern

Nachdem bei der Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe an p-Nitrophenyl- und Thiophenylestern Schwierigkeiten aufgetreten waren, wurde geplant, die Cyclisierung mit dem N-Hydroxyphthalimidester des Thioäthers V durchzuführen. Dazu musste vorher untersucht werden, ob N-Hydroxyphthalimidester unter den Bedingungen stabil sind, die für die Abspaltung des tert.-Butyloxycarbonyl-Restes erforderlich sind.

Die N-Hydroxyphthalimidester der Carbobenzox-y-aminosäuren sind von G. H. L. NEFKENS und G. I. TESSER als aktive Ester

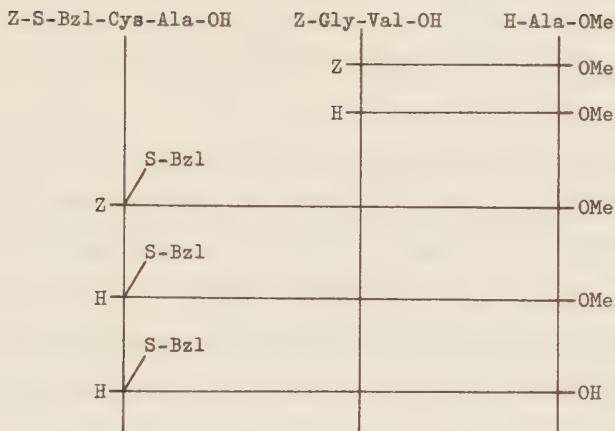
in die Peptidchemie eingeführt worden (33). Sie werden nach der Carbodiimid-Methode mit N-Hydroxyphthalimid hergestellt, das man aus N-Carbäthoxyphthalimid und Hydroxylamin erhält.

Nach diesem Verfahren wurde der tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin-hydroxyphthalimidester dargestellt. Bei der Behandlung mit Trifluoressigsäure wurde anstatt des L-Alanin-hydroxyphthalimidesters L-Alanin erhalten. Die Cyclisierung des Thioäthers V konnte also nicht über den Hydroxyphthalimidester versucht werden.

2.2 Synthese des Pentapeptides S-Benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alanin und Versuche zu seiner Cyclisierung

Bevor weitere Anstrengungen zur Synthese eines heterodeten Cyclopeptides, das den Ring A eines Phalloin-Modelles darstellt, gemacht wurden, sollten an einem Pentapeptid verschiedene Methoden zur Cyclisierung untersucht werden. Nach dem folgenden Schema wurde S-Benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alanin dargestellt:

S c h e m a 5



Die beiden Peptidbindungen wurden nach dem Verfahren über die gemischten Anhydride geknüpft. Die Carbobenzoxy-Gruppe wurde am Tripeptidderivat hydrogenolytisch abgespalten. Beim Pentapeptidderivat musste dazu Bromwasserstoff in Eisessig verwendet werden (34), da die Hydrogenolyse bei schwefelhaltigen Peptiden wegen der Desaktivierung des Pd-Katalysators nicht angewendet werden kann. Zunächst war versucht worden, am geschützten Pentapeptid die Carboxylgruppe vor der Abspaltung des Carbobenzoxy-Restes freizulegen. Die Verseifung der Estergruppe war jedoch wegen der geringen Löslichkeit des Pentapeptidderivates in den für diese Reaktion wählbaren Lösungsmitteln sehr schwierig und gelang

nur befriedigend mit 1 n Natronlauge in Pyridin. Vorteilhafter war es, vor der Verseifung den Carbobenzoxy-Rest zu entfernen. Die Sulfhydrylgruppe blieb für die Cyclisierungsversuche durch den Benzyl-Rest geschützt.

Versuche zur Cyclisierung wurden zunächst nach der Anhydrid-Methode durchgeführt. Dieses Verfahren wandten erstmals R. A. BOISSONNAS und I. SCHUMANN zur Peptidcyclisierung an (35). Es wurde auch von TH. WIELAND, K. FRETER und E. GROSS zur Cyclisierung des Ringes A an einem Phalloin-Modell benutzt (12). Zur Cyclisierung nach diesem Verfahren wird das Peptid mit Chlorameisensäureäthylester zur Bildung des gemischten Anhydrides umgesetzt. Die Aminogruppe wird durch den frei werdenden Chlorwasserstoff geschützt und so die Bildung von Urethan verhindert. Durch Zusatz von Triäthylamin wird dann die Aminogruppe für die Reaktion mit dem gemischten Anhydrid bereit gemacht.

Bei dem durchgeführten Versuch wurde aber im Elektropherogramm bei pH 6,5 ausser einer am Start bleibenden, mit Ninhydrin nicht reagierenden Verbindung eine ebenfalls mit Ninhydrin nicht anfärbbare Substanz nachgewiesen, die zur Anode wandert. Bei dieser Säure kann es sich nur um das Urethan handeln, das durch den Angriff des Chlorameisensäureäthylesters auf die Aminogruppe gebildet wurde.

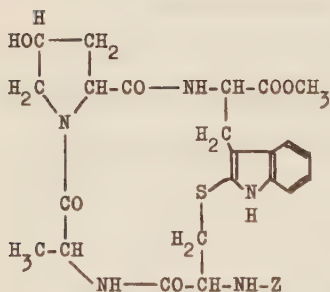
Mit einem freien Peptid verläuft also die Cyclisierung nach dieser Methode nicht ohne störende Nebenreaktion. Die Amino-
gruppe muss bereits vor der Einwirkung des Chlorameisen-
säureäthylesters durch Salzbildung geschützt werden.

Das dargestellte Pentapeptid wurde erfolgreich mit Dicyclo-
hexylcarbodiimid cyclisiert. Dieses Verfahren diente bereits
TH. WIELAND und K. W. OHLY zur Synthese eines cyclischen
Hexapeptides (36). K. VOGLER und Mitarbeitern gelang die
Polymyxin-Synthese bei Verwendung eines 300fachen Über-
schusses des Reagenzes (37). Bei dem ausgeführten Cycli-
sierungsversuch wurde eine Substanz isoliert, die elektro-
phoretisch bei pH 1,9 und pH 6,5 einheitlich war, in beiden
Fällen am Start liegen blieb und sich nicht mit Ninhydrin
anfärben liess.

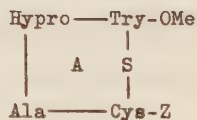
Nachdem die Untersuchungen über die Cyclisierung so weit
durchgeführt waren, gelang R. SARGES der Ringschluss an
einem Phalloin-Modell mit Äthoxyacetylen (32). Dieses Rea-
genz war von J. A. ARENS zur Knüpfung der Peptidbindung ein-
geführt worden (38). E. A. MOROZOVA und S. M. ZHENODAROVA
führten damit erstmalig die Cyclisierung eines Peptides
durch (39). Ein grosser Vorteil dieser Methode ist, dass
bei der Synthese aus dem Reagenz eine leicht entfernbare
Verbindung entsteht, nämlich Essigsäureäthylester.

Die eigenen Cyclisierungsversuche wurden abgebrochen, da auch für die Synthese des im Abschnitt 2.3 beschriebenen heterodeten Cyclopeptides die Anwendung von Äthoxyacetylen zum Ringschluss vorgesehen wurde.

2.3 Synthese des cyclo-(L-Alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxyl-L-alanyl-(β)-sulfides (VIII)



abgekürzt:



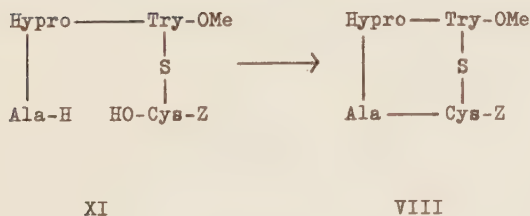
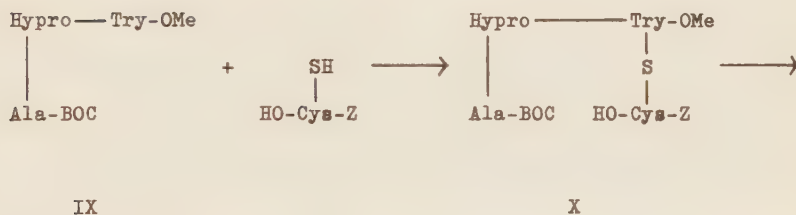
VIII

Z = Carbobenzoxyl

Bei dem weiteren Bestreben, den Ring A eines Phalloin-ähnlichen Cyclopeptides zu synthetisieren, wurde nun L-Hydroxyprolin anstatt des seither in dieser Arbeit benutzten L-Prolins

verwendet. Die Sequenz der Aminosäuren entspricht noch dem von TH. WIELAND und W. SCHÖN (6) erhaltenen Ergebnis. Der Aufbau der Verbindung VIII erfolgte auf zwei Wegen, die in Schema 6 und Schema 7 skizziert sind:

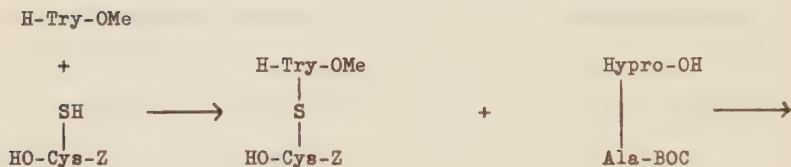
S c h e m a 6



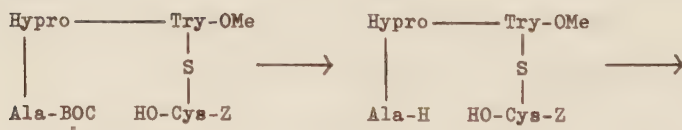
Dieses Schema entspricht dem in Abschnitt 1 angegebenen Weg d).

Die nach Abspaltung ihrer tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe zu cyclisierende Verbindung X entsteht bei der Thioäthersynthese aus dem geschützten Tripeptid IX und N-Carbobenzoxyl-L-cystein.

S c h e m a 7

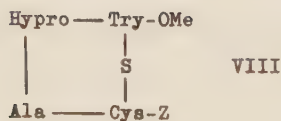


XII



X

XI



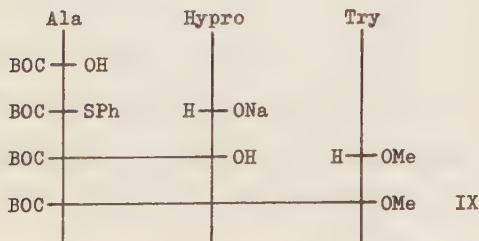
Schema 7 entspricht dem in Abschnitt 1 angegebenen Weg e).

Die Verbindung X wurde hier durch eine Peptidsynthese aus tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolin und dem aus N-Carbobenzoxyl-L-cystein und L-Tryptophanmethylester-trichloracetat dargestellten Thioäther XII gebildet.

2.31 Synthese des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbобенzoxyl-L-alanyl-(8))-sulfides (X) aus tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolyl-L-tryptophanmethylester (IX) und N-Carbobenzoxyl-L-cystein (Schema 6)

Zunächst wurde der Thioäther X aus dem geschützten Tripeptid IX und N-Carbobenzoxyl-L-cystein nach Schema 6 dargestellt. Das Tripeptidderivat wurde auf folgende Weise aufgebaut:

S c h e m a 8



Der tert.-Butyloxycarbonyl-L-alaninthiophenylester wurde nach dem Anhydrid-Verfahren synthetisiert (24). Die Umsetzung mit dem Natriumsalz des L-Hydroxyprolins lieferte kristallines tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolin, das mit L-Tryptophanmethylester-hydrochlorid nach dem Anhydrid-Verfahren das gewünschte Tripeptidderivat IX ergab. Die Verbindung fiel in amorpher Form an, war aber elektrophoretisch rein.

Aus den Ansätzen zur Synthese des Thioäthers X wurde wie im Falle der Synthese des Thioäthers V ein braunes Rohprodukt isoliert, das noch erhebliche Mengen an Ausgangsstoffen enthielt, die durch präparative Papierelektrophorese abgetrennt wurden.

Um die Ausbeute zu erhöhen und das Auftreten eines stark gefärbten Rohproduktes zu verhindern, wurde die Thioäthersynthese in Gegenwart von Triäthylamin durchgeführt. Da früher festgestellt wurde, dass kein Thioäther gebildet wird, wenn die Base bereits bei der Bildung des Sulfenylchlorides anwesend ist, wurde sie jetzt erst mit der Tryptophan-Komponente der Lösung des Sulfenylchlorides zugefügt. Dabei blieb wie erwartet das Auftreten der roten Farbe aus. Die Bildung des Thioäthers wurde nicht verhindert. Das Rohprodukt war nur schwach gelb gefärbt. Die Ausbeute

war jedoch nicht merklich besser.

2.32 Synthese des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfides (X) aus tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolin und (L-Tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfid (XII) (Schema 7)

Um auf rationellere Weise zu dem Thioäther X zu gelangen, wurde versucht, die Synthese gemäss Schema 7 durchzuführen. Dieser Weg führte zu zufriedenstellenden Ausbeuten. Sehr glatt verlief die Synthese des (L-Tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfides (XII), einem Derivat des Tryptathionins, aus L-Tryptophanmethylester-trichloracetat und N-Carbobenzoxy-L-cystein. Das Hydrochlorid des L-Tryptophanmethylesters konnte wegen seiner Unlöslichkeit in den erforderlichen Lösungsmitteln nicht verwendet werden. Die Verbindung XII mit einer freien Aminogruppe und einer freien Carboxylgruppe liegt als Zwitterion vor und fiel bei der Synthese in fast reiner und nur schwach gefärbter Form aus. Sie wurde als Triäthylammoniumsalz mit tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolin nach der Anhydrid-Methode zum Thioäther X umgesetzt, der ohne präparative Papierelektrophorese elektrophoretisch rein isoliert

werden konnte.

2.33 Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe und Cyclisierung

Bei der Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe am Thioäther X mit Trifluoressigsäure zu dem als Zwitterion vorliegenden Thioäther XI wurde kein elektrophoretisch reines Produkt erhalten. Im Elektropherogramm bei pH 1,9 traten zwei weitere mit Ninhydrin eine schwache violette Farbe ergebende Stoffe auf, die durch präparative Elektrophorese auf Papier abgetrennt wurden.

Die Cyclisierung des Thioäthers XI zum cyclo-(L-Alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(8))-sulfid (VIII) erfolgte mit Äthoxyacetylen. E. A. MOROZOVA und S. M. ZHENODAROVA hatten mit diesem Reagenz erstmalig ein Hexapeptid mit 24 % Ausbeute cyclisiert (39). Sie arbeiteten in hoher Verdünnung mit Äthanol und Wasser als Lösungsmittel und einem grossen Überschuss an Äthoxyacetylen. Die Reaktionszeit wurde durch Erwärmen auf 60°-70° von einigen Tagen auf Stunden herabgesetzt.

Nach diesen Richtlinien wurde die Cyclisierung in einer 10^{-3} molaren Lösung des Thioäthers XI in Äthanol mit der 300fachen Menge Äthoxyacetylen durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug 7 Stunden bei 65° . Anschliessend blieben die Ansätze über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Die Elektropherogramme zeigten bei pH 1,9 stets nur eine mit Ninhydrin nicht anfärbbare Substanz am Start, die mit Zimtaldehyd/HCl eine blaue Farbe ergab. Im Elektropherogramm bei pH 6,5 zeigte sich jedoch, dass das Produkt der Cyclisierung nicht einheitlich war. Es trat neben dem am Start liegenbleibenden Hauptprodukt eine zur Anode wandernde Substanz in geringer Konzentration auf. Aus der negativen Reaktion mit Ninhydrin lässt sich schliessen, dass durch einen Angriff des Äthoxyacetylens auf die Aminogruppe eine Verbindung entstanden ist, die nicht zur weiteren Cyclisierung befähigt ist. Zu ihrer Abtrennung wurde das Reaktionsprodukt in Methanol gelöst und die cyclische Verbindung durch Zusatz von Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser ausgefällt. Das saure Nebenprodukt blieb dabei in Lösung. Der isolierte cyclische Thioäther VIII zeigte das für Phalloidin und Phalloin charakteristische UV-Spektrum.

Bei der anschliessenden Verseifung der Methylestergruppe am Tryptophan-Rest traten überraschenderweise im Elektropherogramm bei pH 6,5 zwei saure Verbindungen auf. Sie ergaben

mit Zimtaldehyd/HCl eine blaue und mit Ninhydrin keine Farbe. Der Cyclus konnte also weder an einer Peptidbindung noch an der Thioätherbindung bei der Verseifung geöffnet worden sein. Das bei der Cyclisierung entstandene neutrale Produkt war also nicht einheitlich.

Bei diesem Stand der Arbeit fand H. W. SCHNABEL (8), dass entgegen dem früheren Befund (6, 10) die Positionen von L-Alanin und L-allo-Hydroxyprolin im Ring A des Phalloidins und Phalloins vertauscht werden müssen. Da R. SARGES (14, 32) den Aufbau eines Phalloin-ähnlichen Cyclopeptides mit der korrigierten Aminosäuresequenz durchführte, wurde die eigene Arbeit über den Aufbau des Ringes A abgebrochen.

2.4 Synthese des Tryptathionins

Am Beispiel der Synthese des Tryptathionins (II) sollte untersucht werden, mit welchen Komponenten die Thioäthersynthese am vorteilhaftesten durchgeführt wird. Es wurden zunächst L-Cysteinderivate mit acylierter Aminogruppe und L-Tryptophanmethylester-trichloracetat verwendet, da diese Ausgangsstoffe in den zur Thioäthersynthese bewährten Lösungsmitteln gut löslich sind. Ferner wird durch die Acylierung des Cysteins bei der Darstellung des Sulfenyl-

chlorides ein Angriff des N-Chlorsuccinimides auf die Amino-
gruppe verhindert.

2.41 Versuche mit N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein

Da bei der Behandlung Tryptophan-haltiger Peptidderivate mit Bromwasserstoff in Eisessig stark violett gefärbte Produkte gebildet werden, wurde statt der Carbobenzoxy-Gruppe zuerst die unter milderen Bedingungen abspaltbare tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe zum Schutz der Aminogruppe des L-Cysteins bei der Synthese eines Tryptathioninderivates verwendet.

Das tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein wurde über S-Benzyl-L-cystein und N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystein erhalten. Seine Darstellung aus N,N'-Di-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystin durch Reduktion mit Wasserstoff in statu nascendi ist wegen der Labilität der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe gegenüber Säuren nicht möglich.

Die Thioäthersynthese mit tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein und L-Tryptophanmethylester-trichloracetat verlief nicht gut. Neben grossen Mengen der Ausgangsstoffe traten im Elektropherogramm bei pH 1,9 drei weitere mit Ninhydrin

anfärbbare Substanzen in geringer Konzentration auf. Der Thioäther, der wie XII ein Zwitterion ist, schied sich nicht aus dem Reaktionsgemisch ab und konnte auch nicht isoliert mit Äther gefällt werden. Eine elektrophoretische Reinigung des mit Äther gefällten Rohproduktes war nicht möglich, da sich die Wanderungsstrecken der Nebenprodukte nicht genügend von der des gewünschten Reaktionsproduktes unterschieden. Es gelang nur eine Abtrennung der nicht umgesetzten Ausgangsstoffe.

Auch durch Gelfiltration an Sephadex G 25 gelang weder mit 0,05 n Ammoniaklösung noch mit Methanol : Wasser = 1 : 3 als Fließmittel eine Trennung des Substanzgemisches. Fraktionen mit dem UV-Spektrum des Phalloidins erwiesen sich im Elektropherogramm als uneinheitlich. Ebenfalls ohne Erfolg war die Säulenchromatographie an Kieselgel mit Methanol : Wasser = 1 : 1. Das durch präparative Elektrophorese vorgereinigte Produkt konnte gleichfalls nicht durch Säulenchromatographie an Kieselgel rein erhalten werden.

2.42 Versuche mit N-Trifluoracetyl-L-cystein

Die Thioäthersynthese wurde nun mit N-Trifluoracetyl-L-cystein versucht. Der Trifluoracetyl-Rest war von F. WEYGAND

und R. GEIGER zum Schutze der Aminogruppe in die Peptidchemie eingeführt worden (40). Da er bereits mit 0,2 n Natronlauge innerhalb von Minuten abgespalten werden kann (41), sollte es möglich sein, aus dem mit N-Trifluoracetyl-L-cystein und L-Tryptophanmethylester-trichloracetat dargestellten Tryptathioninderivat durch Behandlung mit Natronlauge in einem Schritt zum freien Tryptathionin zu gelangen. Das N-Trifluoracetyl-L-cystein wurde aus N,N'-Di-trifluoracetyl-L-cystin durch Reduktion mit Wasserstoff in statu nascendi erhalten.

Leider verlief die Thioäthersynthese sehr schlecht. Der Umsatz war so gering, dass es nicht lohnend erschien, auf diesem Wege das Tryptathionin darzustellen.

2.43 Darstellung des Tryptathionins aus (L-Tryptophanmethylester-yl(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfid (XII)

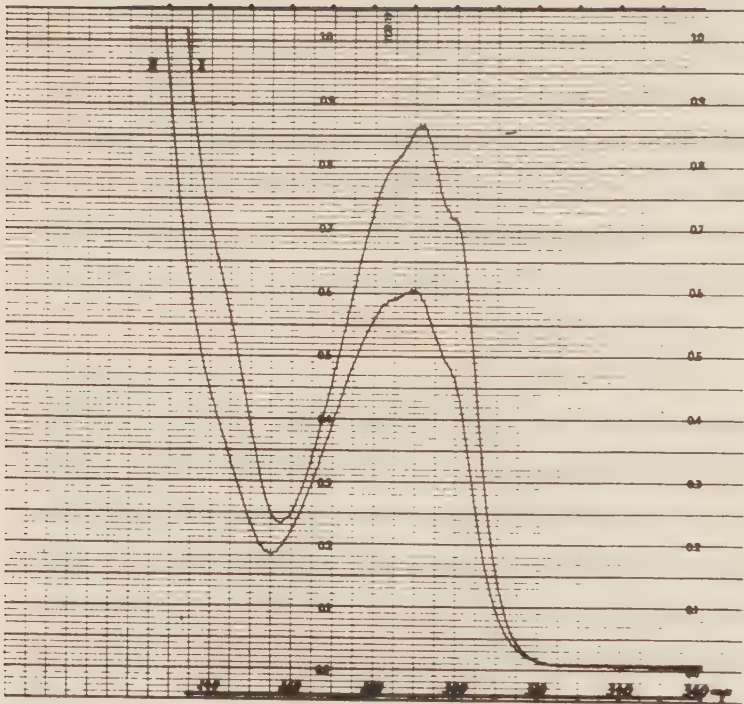
Da sich die Hoffnung nicht erfüllt hatte, über Derivate des Tryptathionins, die den tert.-Butyloxycarbonyl- und den Trifluoracetyl-Rest an der Aminogruppe des L-Cystein-Teiles tragen, auf lohnendem Wege zum freien Tryptathionin zu gelangen, wurde diese Diaminodicarbonsäure aus dem Thioäther XII dargestellt.

Wie R. SARGES fand (32), ist bei Thioäthern vorliegender Struktur eine Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppe mit Natrium in flüssigem Ammoniak nicht möglich; das charakteristische UV-Spektrum des Thioäthers tritt danach nicht mehr auf. Die hydrogenolytische Entfernung dieser Schutzgruppe ist wegen der Vergiftung des Pd-Katalysators ebenfalls nicht möglich. Ein Versuch mit dem Thioäther XII ergab nur eine geringe Entwicklung von Kohlendioxid. Im Elektropherogramm waren neben der eingesetzten Substanz Spuren von L-Alanin und L-Tryptophanmethylester nachweisbar. Die geringfügig eingetretene Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppe war also von einer gleichzeitigen hydrogenolytischen Spaltung des Thioäthers begleitet. Auch die von F. WEYGAND und W. STEGLICH vorgeschlagene Methode (42), mit siedender Trifluoressigsäure den Carbobenzoxy-Rest zu entfernen, wurde auf ihre Anwendbarkeit geprüft. Nach dieser Behandlung war jedoch die für Thioäther charakteristische blaue Farbe mit Zimtaldehyd/HCl im Elektropherogramm verschwunden.

Daher musste Bromwasserstoff in Eisessig verwendet werden. R. A. BOISSONNAS und Mitarbeiter berichteten (43), dass mit dieser Methode bei Tryptophan-Peptiden eine Zersetzung des Indolteils eintritt, die durch ein verändertes UV-Spektrum angezeigt wird. Sie empfehlen einen Zusatz von Diäthylphosphit

zu dem Reagenz, um die Zersetzung zu vermeiden. Die eigenen Versuche ergaben, dass mit einer 20 %igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig ein stark violett gefärbtes Produkt erhalten wird, das im Elektropherogramm zahlreiche Nebenprodukte erkennen lässt. Führt man die Reaktion jedoch in verdünnter Lösung aus, so gewinnt man auch ohne Zusatz von Diäthylphosphit ein reineres Produkt, das noch die blaue Farbe mit Zimtaldehyd/HCl ergibt.

Nachdem so gefunden war, dass die Einwirkung von genügend verdünntem Bromwasserstoff in Eisessig nicht zur Zerstörung der Thioätherstruktur führt, wurde zunächst die Methylestergruppe am L-Tryptophan-Teil des Tryptathioninderivates XII alkalisch hydrolysiert. Das elektrophoretisch rein erhaltene Monocarbobenzoxy-Tryptathionin wurde dann mit einer 12 %igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig in das freie Tryptathionin übergeführt. Das Rohprodukt wurde durch präparative Papierelektrophorese bei pH 1,9 gereinigt. Das UV-Spektrum der reinen Substanz zeigt die charakteristischen Merkmale des Phalloidin-Spektrums.



UV-Spektren

von Phalloidin (I) und von Tryptathionin (II)

in Wasser aufgenommen mit dem

Recording Spectrophotometer 'Cary 14' der

Applied Physics Corporation in Monrovia / California

2.5 Versuche zur Synthese von Tryptathionin und Tryptathionin-Derivaten aus verschiedenen Komponenten nach der N-Chlorsuccinimid-Methode

Im folgenden Abschnitt werden einige Versuche beschrieben, die mit dem Ziel ausgeführt worden sind, auf einem möglichst kurzen Syntheseweg, ausgehend von L-Cystein und L-Tryptophan oder geeigneten Derivaten dieser Aminosäuren, zum Tryptathionin oder seinen Derivaten zu gelangen.

Zuerst wurde untersucht, ob eine Acylierung an der Aminogruppe des L-Cysteins unbedingt erforderlich ist oder bereits ihre Protonisierung ausreicht, damit die Bildung des Sulfenylchlorides ohne störende Nebenreaktionen verläuft. Zu diesem Zweck wurde die Thioäthersynthese mit L-Cysteinmethylester-trichloracetat und L-Tryptophan durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde die Bildung des Sulfenylchlorides in Tetrahydrofuran vorgenommen, in dem die Komponenten der Reaktion, L-Cysteinmethylester-trichloracetat und N-Chlorsuccinimid, gut löslich sind. Dabei entstand ein weisser Niederschlag. Das L-Tryptophan wurde mit Hilfe von Trichloressigsäure in Chloroform gelöst, wozu mehr als die äquivalente Menge erforderlich ist. Das Elektropherogramm des Ansatzes zeigte sowohl im Niederschlag als auch in der Lösung eine geringe

Menge des Thioäthers. Bei der Vertauschung der Lösungsmittel trat eine Fällung erst bei der Zugabe des L-Tryptophans auf. Auch in diesem Ansatz war nur wenig Thioäther gebildet worden. Wurde allein Chloroform benutzt, so blieb die Reaktionslösung ständig klar, es war aber kein Thioäther nachweisbar.

Aus dem Verlauf dieser Versuche ist zu ersehen, dass zwar an einem Cysteinderivat mit protonisierter Aminogruppe die Bildung des Sulfenylchlorides nicht völlig unterbunden wird, die Reaktion aber nur mit geringer Ausbeute verläuft.

Die Versuche, mit L-Cystein und L-Tryptophan direkt zum Tryptathionin zu gelangen, schlugen alle fehl. Die beiden Aminosäuren wurden mit Trichloressigsäure in den benutzten Lösungsmitteln gelöst. Bei Versuchen, die entweder in Aceton, Chloroform und Tetrahydrofuran oder in Kombinationen dieser Lösungsmittel durchgeführt wurden, konnten in keinem Falle merkliche Mengen Tryptathionin elektrophoretisch nachgewiesen werden, so dass eine direkte Synthese aus den freien Aminosäuren nach dieser Methode nicht möglich ist.

Es sollte nun versucht werden, durch oxydative Kupplung von L-Cystein und L-Tryptophan mittels Eisen-III-nitrat in wässriger Lösung zum Tryptathionin zu gelangen.

E. BAUMANN beobachtete, dass die Oxydation des Cysteins zum Cystin mit Sauerstoff durch Eisen-III-salze katalysiert wird (45). Dabei entsteht eine violette Farbe, die beim Stehen verschwindet und beim Schütteln mit Luft wieder auftritt, bis alles Cystein verbraucht ist. Nach O. WARBURG überträgt das Eisen den Sauerstoff durch Valenzwechsel (46). Das violette Eisen-III-salz des Cysteins oxydiert überschüssiges Cystein zu Cystin. Das dabei entstehende farblose Eisen-II-salz des Cysteins wird vom Sauerstoff zum Eisen-III-salz oxydiert.

Die Hoffnung, dass anstatt der Oxydation zum Cystin bei diesen Versuchen eine oxydative Kupplung der Sulfhydrylgruppe mit der 2-Stellung des Indolringes eintritt, erfüllte sich leider nicht. Nach mehreren Stunden war in den Ansätzen elektrophoretisch nur L-Tryptophan und L-Cystin nachweisbar.

Auch der direkte Umsatz von L-Tryptophan mit L-Cystin in wässriger Lösung, bei dem unter Bildung von L-Cystein das Tryptathionin entstehen sollte, führte weder bei Raumtemperatur noch bei 115° zu einem Angriff des L-Cystins auf die 2-Stellung des Indolringes.

Um die Darstellung von N-Acyl-L-cysteinderivaten durch

Reduktion aus N,N'-Diacyl-L-cystinderivaten zu umgehen, wurden Versuche unternommen, die Thioäthersynthese direkt mit N,N'-Diacyl-L-cystinderivaten und N-Chlorsuccinimid unter Zusatz von Lithiumchlorid durchzuführen. Dabei sollte eine Spaltung des Disulfides auf folgende Weise eintreten können:



Versuche mit N,N'-Di-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystin, das aus N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein durch längeres Lagern an der Luft entstanden war, und mit N,N'-Dicarbobenzoxy-L-cystin ergaben bei der Umsetzung mit L-Tryptophanmethylestertrichloracetat nach diesem Verfahren geringe Mengen des Tryptathioninderivates. Bei der Bildung des Sulfenylchlorides nahm die Lösung die stets beobachtete schwache gelbe Farbe an. Die Ausbeuten waren allerdings so niedrig, dass die Verwendung der L-Cysteinderivate günstiger ist. Die Spaltung des L-Cystinderivates mit N-Chlorsuccinimid und Chloridionen unter Bildung des Sulfenylchlorides ist jedenfalls möglich.

2.6 Versuche zur Synthese von Tryptathionin und Tryptathionin-Derivaten aus verschiedenen Komponenten nach der Dirhodan-Methode

Da die Thioäthersynthese über das Sulfenylchlorid häufig sehr unbefriedigend verlief, wurde versucht, ob durch Einführung der Rhodanogruppe anstatt des Chlors der Schwefel genügend aktiviert werden kann.

R. G. HISKEY und Mitarbeiter stellten unsymmetrische aliphatische Disulfide auf folgendem Wege dar (44):



Nach diesem Verfahren konnte auch aus N-Carbobenzoxyl-L-cystein und L-Cystein-hydrochlorid das Monocarbobenzoxyl-L-cystin dargestellt werden (47).

Es wurde nun die Anwendbarkeit dieser Methode zur Darstellung von Thioäthern vom Typ des Tryptathionins untersucht. Der Erfolg der Synthese hing vom verwendeten Lösungsmittel und den Ausgangskomponenten ab.

Wurde das Dirhodan, das mit Brom aus Bleirhodanid erhalten

wird (48), in Äther dargestellt und mit N-Carbobenzoxy-L-cystein umgesetzt, so wurde bei Zugabe von L-Tryptophanmethylester-trichloracetat in Tetrahydrofuran kein Thioäther gebildet. Die Synthese verlief jedoch mit diesen Komponenten erfolgreich, wenn nur Tetrahydrofuran verwendet wurde. Die Ausbeute war jedoch geringer als bei der Synthese über das Sulfenylchlorid.

N-Trifluoracetyl-L-cystein ergab mit L-Tryptophanmethylester-trichloracetat nach dieser Methode ebenfalls den Thioäther. Jedoch entstanden in diesem Falle wieder mehrere Nebenprodukte, die auch bei der N-Chlorsuccinimid-Methode aufgetreten waren.

Mit L-Cystein-hydrochlorid und L-Tryptophan, das mit der äquivalenten Menge Trichloressigsäure in Lösung gebracht wurde, verlief die Synthese des Tryptathionins in Dimethylformamid ergebnislos. Auch mit N-Chlorsuccinimid war diese direkte Synthese des Tryptathionins nicht gelungen.

L-Cysteinmethylester-trichloracetat und L-Tryptophanmethylester-trichloracetat ergaben in Tetrahydrofuran ebenfalls keinen Thioäther.

In Ansätzen mit N-Carbobenzoxy-L-cysteinmethylester und

Carbobenzoxy-L-tryptophanmethylester wurde sowohl bei Verwendung von Tetrahydrofuran als auch von Dimethylformamid als Lösungsmittel im Dünnschichtchromatogramm kein Thioäther nachgewiesen.

Die zur Synthese des Tryptathionins und seiner Derivate ausgeführten Versuche lassen erkennen, dass die Thioäthersynthese nur mit bestimmten Komponenten erfolgreich verläuft. Es empfiehlt sich dabei, die Cystein-Komponente an der Aminogruppe zu acylieren. Am brauchbarsten zu diesem Zweck ist die Carbobenzoxy-Gruppe, deren Abspaltung mit einer verdünnten Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig in befriedigender Weise gelingt. Die geeignetsten Lösungsmittel sind Chloroform und Tetrahydrofuran.

Der erfolgreichste Weg zum Tryptathionin führt über den Thioäther aus N-Carbobenzoxy-L-cystein und L-Tryptophanmethylester-trichloracetat.

Ein Vergleich der N-Chlorsuccinimid-Methode mit der Dirhodan-Methode zeigt, dass erstere die überlegenere ist. Die Sulfonylchloride sind aktiver als die Sulfonylrhodanide.

3

EXPERIMENTELLER TEIL

=====

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden im Schmelzblock bestimmt und sind unkorrigiert.

Angaben zur Papierelektrophorese und Chromatographie

Die elektrophoretischen Untersuchungen wurden je nach der Natur der Stoffe in neutralem oder saurem Puffer auf dem Papier Nr. 212 der Firma MACHEREY, NAGEL & CO durchgeführt.

Für die präparative Papierelektrophorese wurde das Papier Nr. 827 ff der Firma MACHEREY, NAGEL & CO benutzt.

Neutraler Puffer: pH 6,5

Pyridin : Eisessig : Wasser = 10 : 1 : 89

Saurer Puffer: pH 1,9

Eisessig : Ameisensäure : Wasser = 3 : 1 : 16

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden im Lösungsmittel H (sek. Butanol : Ameisensäure : Wasser = 75 : 15 : 10) absteigend auf dem Papier Nr. 2043 b der Firma

SCHLEICHER & SCHÜLL durchgeführt.

Zur Dünnschichtchromatographie wurde das Kieselgel G nach STAHL von der Firma E. MERCK AG verwendet.

Beschreibung der Nachweisreaktionen und Zusammensetzung der Reagenzien

Auf den Elektropherogrammen und Chromatogrammen wurden die folgenden Reaktionen durchgeführt:

1. Ninhydrin-Reaktion:

Freie Aminogruppen werden durch Farbreaktionen mit Ninhydrin bei 85° nachgewiesen.

Zusammensetzung der Lösung:

1 g Ninhydrin
600 ml Methanol
350 ml n-Butanol
30 ml 2 n Essigsäure

2. UV-Absorption:

Nach TH. WIELAND und L. BAUER (49) treten Substanzen, die einen UV-absorbierenden Chromophor enthalten, nach Besprühen mit einer verdünnten methanolischen Fluorescein-Lösung im UV-Licht von 254 nm durch Fluoreszenzlöschung als dunkle Flecken auf gelb-grün fluoreszierendem Untergrund hervor.

Damit lassen sich Acyl-aminosäuren und -peptide erkennen.

3. Chlor-Methode:

Nach der von TH. WIELAND und K. DOSE (50) modifizierten Methode (51) werden Verbindungen mit einer -NH- = Gruppe in die -NCl- = Verbindungen übergeführt. Diese oxydieren o-Tolidin zu einem blauen chinoiden Farbstoff.

Reagenzien:

1. 1 %ige Lösung von tert.-Butylhypochlorit in Tetrachlorkohlenstoff
2. gesättigte Lösung von o-Tolidin in 2 %iger Essigsäure und 0,05 n Kaliumjodidlösung, gemischt im Verhältnis 1 : 1

4. Zimtaldehyd-Reaktion:

Indolderivate lassen sich nach TH. WIELAND und L. BAUER (49) mit Zimtaldehyd in einer Chlorwasserstoff-Atmosphäre anfärben. Tryptophan ergibt eine braune Farbe. Befindet sich in 2-Stellung am Indolring eine Thioäthergruppe, so tritt eine blaue Farbe auf.

Reagenz:

2,5 %ige Lösung von Zimtaldehyd in Methanol

5. Nitroprussidnatrium-Reaktion:

Cystein und seine Derivate mit freier SH-Gruppe ergeben mit Natriumnitrosylpentacyanoferrat $\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO})$ in einer Ammoniak-Atmosphäre eine violette Farbe. Mit Cystin und dessen Derivaten tritt die Farbe erst nach Reduktion mit Natriumsulfit auf.

1. Carbobenzoxy-L-prolin (52)

20 g (0,174 Mol) L-Prolin werden in 87 ml 2 n Natronlauge gelöst und in Eis gekühlt. Unter kräftigem Mischen mit einem Vibro-Mischgerät lässt man gleichzeitig 34,8 g (0,204 Mol) Carbobenzoxychlorid und 130 ml 2 n Natronlauge innerhalb von 15 Minuten zutropfen. Nachdem der Ansatz noch 2 Stunden bei Raumtemperatur gestanden hat, wird das Reaktionsprodukt zweimal mit 25 ml Äther zur Entfernung nicht umgesetzten Carbobenzoxychlorides ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wird gegen Kongorot mit 6 n Salzsäure angesäuert, wobei man zweckmässigerweise nicht die Säure zugibt, sondern umgekehrt die Lösung in die berechnete Menge Salzsäure einfliessen lässt. Das abgeschiedene ölige Produkt wird in Essigester aufgenommen und die wässrige Lösung mehrmals mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterextrakte werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Essigester wird im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird mit einer Probe festen Carbobenzoxy-L-prolins angeimpft und gelangt so schnell zur Kristallisation. Ist keine kristallisierte Probe zugänglich, gelingt die Kristallisation nach längerem Verreiben mit Petroläther. Das erhaltene Produkt ist elektro-phoretisch rein.

Ausbeute: 39 g = 90 % d. Th., Fp: 76° - 77°

2. L-Tryptophanmethylester-hydrochlorid

a) Darstellung mit Methanol und Chlorwasserstoff (53):

10,2 g (0,05 Mol) L-Tryptophan werden in 200 ml absolutem Methanol suspendiert und durch Einleiten von getrocknetem Chlorwasserstoff gelöst. Unter Kühlung mit Eis wird bis zur Sättigung eingeleitet. Dabei färbt sich die Lösung violett. Anschliessend wird das Methanol mit dem gebildeten Wasser im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 20 ml absolutem Methanol durch Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst und mit absolutem Äther bis zur beginnenden Kristallisation versetzt. Das erhaltene schwach violett gefärbte Produkt ist elektrophoretisch rein.

Ausbeute: 11,0 g = 86,5 % d. Th., Fp: 214° (Zers.)

b) Darstellung mit Methanol und Thionylchlorid (22, 43):

Unter Rühren werden 4 ml (0,055 Mol) Thionylchlorid in 50 ml im Eis-Kochsalz-Bad gekühltes Methanol getropft und anschliessend 10,2 g (0,05 Mol) L-Tryptophan portionsweise eingetragen. Die Temperatur soll bei beiden Operationen nicht über -5° steigen. Hierauf lässt man das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur kommen und dann 2 Stunden bei 45°

reagieren. Während dieser Zeit löst sich die Aminosäure auf. Danach wird der Ansatz wie unter a) beschrieben verarbeitet. Man erhält ein farbloses Produkt, das elektrophoretisch rein ist.

Ausbeute: 12,0 g = 94 % d. Th., Fp: 214° (Zers.)

3. Carbobenzoxyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester

2,492 g (0,01 Mol) Carbobenzoxyl-L-prolin werden in 25 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und nach Zugabe von 1,4 ml (0,01 Mol) Triäthylamin auf -10° gekühlt. Unter Rühren werden 0,96 ml (0,01 Mol) Chlorameisensäureäthylester zugetropft. Die Abscheidung von Triäthylammoniumchlorid zeigt die Bildung des gemischten Anhydrides an. Nach 30 Minuten wird die Suspension von 2,547 g (0,01 Mol) L-Tryptophanmethylesterhydrochlorid in 25 ml absolutem Tetrahydrofuran, der zur Bildung des freien Esters 1,4 ml (0,01 Mol) Triäthylamin zugefügt wurden, in die Anhydridlösung gegossen. Die Entwicklung von Kohlendioxid zeigt den Verlauf der Peptidsynthese an. Man entfernt das Reaktionsgefäß aus dem Kältebad und lässt es Raumtemperatur annehmen. Nach 1 Stunde versetzt man das Reaktionsgemisch zur Auflösung des abgeschiedenen Triäthylammoniumchlorids mit 20 ml Wasser. Das Tetra-

hydrofuran wird anschliessend im Vakuum abdestilliert. Aus der verbleibenden wässrigen Lösung scheidet sich der ölige Carbobenzoxy-dipeptidester ab. Das Produkt wird mit Essigester ausgeschüttelt. Die Extrakte werden mehrmals mit 5 %iger Kaliumhydrogencarbonatlösung so lange ausgeschüttelt, bis beim Ansäuern der Hydrogencarbonatlösung keine Trübung mehr entsteht. Nicht umgesetzte Carbobenzoxy-aminosäure ist damit entfernt. Restlichen Aminosäureester entfernt man durch Ausschütteln mit 2 n Salzsäure. Dann wird die Essigesterlösung mit Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Essigesters im Vakuum bleibt ein amorphes Produkt zurück. Im Elektropherogramm sind keine Ausgangsprodukte der Synthese mehr nachweisbar. Das Produkt ist elektrophoretisch rein. Die Kristallisation gelingt durch Lösen in Äthanol und Zusatz von Wasser.

Ausbeute: 3,07 g = 68 % d. Th., Fp: 70°

Analyse: $C_{25}H_{27}N_3O_5$	berechnet:	gefunden:
MG: 449,49	66,80 % C	66,58 % C
	6,05 % H	6,14 % H
	9,35 % N	9,17 % N

4. tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin (17)

Die Verbindung wird nach dem von R. SCHWYZER und Mitarbeitern (18) angegebenen Verfahren dargestellt. Das benötigte tert.-Butyloxycarbonylazid wird nach der Vorschrift von L. A. CARPINO und Mitarbeitern (19) aus Chlorameisensäurephenylester über tert.-Butyl-phenyl-kohlensäureester (21) und tert.-Butyloxycarbonylhydrazid (21) hergestellt.

10,6 g (0,12 Mol) L-Alanin in 150 ml Wasser, 9,6 g (0,24 Mol) Magnesiumoxid und 25,5 g (0,18 Mol) tert.-Butyloxycarbonylazid in 70 ml Dioxan werden unter kräftigem Rühren in einem mit Rückflusskühler ausgestatteten Kolben 20 Stunden im Wasserbad auf 50° erwärmt. Danach wird das Reaktionsgemisch filtriert und die Lösung im Vakuum bei 50° weitgehend eingeeengt. Die alkalische Lösung wird zur Entfernung des überschüssigen tert.-Butyloxycarbonylazids mit Essigester ausgeschüttelt und bei 0° mit 10 %iger Citronensäure bis pH 4 angesäuert. Dann wird das Produkt mit Essigester extrahiert, die Essigesterlösung mit Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum erhält man ein gelbliches Öl, das elektrophoretisch rein ist. Die Kristallisation gelingt durch Lösen in Äther und Zugabe von Petroläther.

Ausbeute: 11,5 g = 51 % d. Th., Fp: 84°

5. L-Prolinmethylester-hydrochlorid (54)

11,5 g (0,1 Mol) L-Prolin werden nach dem unter 2. a) beschriebenen Verfahren verestert. Die Operation muss wiederholt werden, da beim ersten Mal keine vollständige Veresterung erreicht wird. Das Produkt wird nur als Öl erhalten.

Ausbeute: 10,5 g = 64 % d.Th.

6. tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolinmethylester

3,78 g (0,02 Mol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin und 3,30 g (0,02 Mol) L-Prolinmethylester-hydrochlorid werden nach dem unter 3. beschriebenen Anhydrid-Verfahren umgesetzt. Bei der Aufarbeitung empfiehlt es sich, wegen der Empfindlichkeit des tert.-Butyloxycarbonyl-Restes 10 %ige Citronensäure anstatt 2 n Salzsäure zu verwenden. Das Produkt fällt in öligem Form an und ist nicht zu kristallisieren. Es ist elektrophoretisch einheitlich.

Ausbeute: 5,2 g = 86,5 % d. Th.

7. tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolin

6,0 g (0,02 Mol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolinmethylester werden in 30 ml Aceton gelöst und mit 22 ml 1 n Natronlauge versetzt. Nach 1 Stunde wird mit 10 %iger Citronensäure bis pH 4 angesäuert und das Aceton im Vakuum abdestilliert. Dabei scheidet sich das Produkt in reiner, kristalliner Form ab. Die Mutterlauge wird mit Essigester extrahiert. Der Extrakt wird neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Dabei kristallisiert eine weitere Menge des Produktes aus. Die beiden Fraktionen des tert.-Butyloxycarbonyl-dipeptides sind elektrophoretisch rein. Das Produkt kann aus Äther umkristallisiert werden.

In den Mutterlaugen wurden tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin und L-Prolinmethylester nachgewiesen. Anstatt einer quantitativen Verseifung der Estergruppe ist also die Peptidbindung teilweise gespalten worden.

Ausbeute: 2,23 g = 38 % d. Th., Fp: 155°

Analyse: $C_{13}H_{22}N_2O_5$	berechnet:	gefunden:
MG: 286,32	54,53 % C	54,60 % C
	7,75 % H	7,94 % H
	9,78 % N	9,87 % N

8. tert.-Butyloxycarbonyl-L-alaninthiophenylester

6,62 g (0,035 Mol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin werden in 75 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, mit 4,9 ml (0,035 Mol) Triäthylamin versetzt und auf -10° gekühlt. Unter Rühren werden 3,36 ml (0,035 Mol) Chlorameisensäureäthylester zuge-
getropft. Nach 30 Minuten werden 3,57 ml (0,035 Mol) Thio-
phenol zugefügt und das Reaktionsgefäß auf Raumtemperatur
gebracht. Nach 1 Stunde wird mit 20 ml Wasser das abgeschie-
dene Triäthylammoniumchlorid aufgelöst, das Tetrahydrofuran
im Vakuum abdestilliert und das Produkt in Essigester auf-
genommen. Die Essigesterlösung wird mehrmals mit 5 %iger
Kaliumhydrogencarbonatlösung zur Entfernung nicht umgesetzter
Ausgangsstoffe ausgeschüttelt, neutral gewaschen und ge-
trocknet. Nach Abdestillieren des Essigesters erhält man
einen festen Rückstand, der elektrophoretisch rein ist und
aus Äther/Petroläther umkristallisiert wird.

Ausbeute: 7,43 g = 75 % d. Th., Fp: 119°

Analyse: $C_{14}H_{19}NO_3S$	berechnet:	gefunden:
MG: 281,4	59,77 % C	59,55 % C
	6,81 % H	6,63 % H
	4,98 % N	5,13 % N
	11,38 % S	11,18 % S

9. tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolin

Die Verbindung wird nach der Vorschrift für Carbobenzoxycyl-L-prolin dargestellt (55).

Die Lösungen von 7,20 g (25,6 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alaninthiophenylester in 50 ml Tetrahydrofuran und 2,94 g (25,6 mMol) L-Prolin in 25,6 ml 1 n Natronlauge werden vereinigt, mit Methanol versetzt, bis eine homogene Phase erreicht ist, und 4 Stunden unter Rückfluss auf 65° erwärmt. Danach werden die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in Wasser gelöst und zur Entfernung des gebildeten Thiophenols mit Äther ausgeschüttelt. Beim Ansäuern mit 10 %iger Citronensäure bis pH 3 scheidet sich elektrophoretisch reines Produkt ab. Die Mutterlauge wird mit Essigester extrahiert und aus dem Extrakt eine weitere Menge elektrophoretisch reines Produkt gewonnen.

Ausbeute: 5,02 g = 68,5 % d. Th., Fp: 154°

10. tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophan-
methylester (IV)

4,95 g (17,4 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolin

und 4,43 g (17,4 mMol) L-Tryptophanmethylester-hydrochlorid werden nach dem unter 3. beschriebenen Anhydrid-Verfahren umgesetzt. Bei der Aufarbeitung wird 10 %ige Citronensäure statt 2 n Salzsäure verwendet.

Das Produkt fällt aus Essigester/Petroläther als amorphes Pulver an, das sich elektrophoretisch und chromatographisch im Lösungsmittel H als einheitliche Substanz erweist.

Ausbeute: 7,6 g = 90 % d. Th., Fp: 90° - 95°

11. S-Carbobenzoxyl-L-cystein (56)

Zu einer eisgekühlten Lösung von 8,8 g (0,056 Mol) L-Cysteinhydrochlorid in 100 ml 1 n Natriumhydrogencarbonatlösung, die mit 50 ml Äther bedeckt ist, werden 8,6 g (0,05 Mol) Carbobenzoxylchlorid in einer Portion unter Rühren zugegeben. Nach 1 Stunde lässt man die Lösung Raumtemperatur annehmen und eine weitere Stunde reagieren. Die abgeschiedene kristalline Verbindung wird abgesaugt, nacheinander mit Wasser, Aceton und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Elektropherogramm zeigt eine einheitliche Substanz mit dem Verhalten eines Zwitterions.

Ausbeute: 8,3 g = 65 % d. Th., Fp: 160° (Zers.)

12. N-Carbobenzoxyl-L-cystein aus S-Carbobenzoxyl-L-cystein

583 mg (2,3 mMol) S-Carbobenzoxyl-L-cystein werden mit 0,32 ml (2,3 mMol) Triäthylamin in 35 ml Tetrahydrofuran und 15 ml Wasser gelöst und 5 Stunden unter Stickstoff auf 35° erwärmt. Danach wird im schwachen Stickstoffstrom das Tetrahydrofuran im Vakuum abdestilliert, die wässrige Lösung mit 2 n Salzsäure angesäuert und das Produkt mit Essigester extrahiert. Der neutral gewaschene und getrocknete Extrakt wird im Stickstoffstrom im Vakuum eingedampft. Die Verbindung scheidet sich ölig ab. Das Elektropherogramm zeigt eine einheitliche, bei pH 6,5 zur Anode wandernde Substanz.

Ausbeute: 423 mg = 72,5 % d. Th.

13. N,N'-Dicarbobenzoxyl-L-cystin (29)

9,6 g (0,04 Mol) L-Cystin in 80 ml 1 n Natronlauge werden mit 20,4 g (0,12 Mol) Carbobenzoxylchlorid und 160 ml 1 n Natronlauge nach dem unter 1. beschriebenen Verfahren umgesetzt. Die elektrophoretisch reine Verbindung wird aus Chloroform oder mit Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 16,0 g = 78,5 % d. Th.

Fp: 126° - 128° (aus Chloroform)

93° - 97° (aus Essigester/Petroläther)

Analyse: $C_{22}H_{24}N_2O_8S_2$	berechnet:	gefunden:
MG: 508,55	51,97 % C	51,83 % C
	4,76 % H	4,89 % H
	5,51 % N	5,73 % N
	12,59 % S	12,52 % S

14. N-Carbobenzoxyl-L-cystein aus N,N'-Dicarbobenzoxyl-L-cystin (13, 57)

1,016 g (2 mmol) N,N'-Dicarbobenzoxyl-L-cystin werden in 20 ml Äthanol gelöst. Die Reduktion wird mit 5 g verkuiperten Zinkspänen und 20 ml 1 n Schwefelsäure in einem mit Rückflusskühler ausgestatteten Gefäß durchgeführt, das von Stickstoff durchströmt wird. Man lässt 4 Stunden bei 50° reagieren, filtriert die Lösung und destilliert unter Stickstoff den Alkohol im Vakuum ab. Die saure wässrige Lösung wird mit Essigester extrahiert. Der Extrakt wird neutral gewaschen und getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Essigesters erhält man die ölige Verbindung, die im Elektropherogramm einheitlich ist.

Ausbeute: 834 mg = 81,5 % d. Th.

15. Monocarbobenzoxy-L-cystin

Bei der Umsetzung von äquivalenten Mengen an L-Cystin, Carbobenzoxychlorid und 1 n Natronlauge zur Darstellung des N,N'-Dicarbobenzoxy-L-cystins ist nach dem Ansäuern ein Teil der Fällung nicht in Essigester löslich. Der Niederschlag wird von der mit Essigester extrahierten wässrigen Lösung abfiltriert. Im Elektropherogramm wandert die Substanz bei pH 6,5 zur Anode und gibt mit Ninhydrin eine violette Farbe. Danach muss es sich um Monocarbobenzoxy-L-cystin handeln. Die Verbindung lässt sich durch Auflösen in 5 %iger Kaliumhydrogencarbonatlösung und allmähliches Ansäuern mit 2 n Salzsäure umkristallisieren.

Fp: 190° (Zers.)

Analyse: $C_{14}H_{16}N_2O_6S_2$

MG: 374,42

berechnet:

44,92 % C

4,85 % H

7,48 % N

17,10 % S

gefunden:

44,92 % C

4,98 % H

7,46 % N

16,95 % S

16. (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophan-
methylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(8))-
sulfid (V) (12)

Zu einer auf -15° gekühlten Suspension von 400 mg (3 mMol) N-Chlorsuccinimid in 5 ml absolutem Chloroform wird unter Rühren die Lösung von 765 mg (3 mMol) N-Carbobenzoxy-L-cystein in 5 ml absolutem Chloroform langsam zugetropft. Das Reaktionsgefäß wird dabei von reinstem Stickstoff durchströmt und vor Feuchtigkeit geschützt. Die Lösung mit dem Sulfenylchlorid färbt sich schwach gelb. Nach beendeter Zugabe des N-Carbobenzoxy-L-cysteins wird die Lösung von 728 mg (1,5 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester (IV) in 5 ml absolutem Tetrahydrofuran zugegossen, wobei sich das Reaktionsgemisch rötlich färbt. Nach 1 Stunde wird das Kältebad entfernt und der Ansatz eine weitere Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschliessend wird der Ansatz in Äther getropft, wobei sich eine schwach rotbraun gefärbte, flockige Substanz abscheidet, die durch Zentrifugieren gewonnen wird. Sie zeigt im Elektropherogramm bei pH 6,5 drei Komponenten:

1. eine am Start bleibende Verbindung, die mit Zimtaldehyd/HCl eine braune Farbe ergibt, wie sie für Indolderivate mit freier 2-Stellung charakteristisch ist; es liegt also das

Tripeptidderivat IV vor;

2. eine zur Anode wandernde Verbindung, die mit Zimtaldehyd/HCl eine blaue Farbe ergibt, wie sie für Indolderivate mit einer S-Funktion in 2-Stellung typisch und für den gewünschten Thioäther V zu erwarten ist;
3. eine weiter zur Anode wandernde Verbindung, die als N,N'-Dicarbobenzoxyl-L-cystin identifiziert wurde.

Ausbeute:

In 6 Ansätzen wurden insgesamt 5,124 g (20,2 mMol) N-Carbobenzoxyl-L-cystein und 5,199 g (10,7 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester (IV) eingesetzt. Durch Fällung mit Äther wurden 8,2 g Rohprodukt isoliert; das sind 65 % der Summe aller eingesetzten Komponenten.

Es gelingt nicht, aus dem in Essigester gelösten Rohprodukt durch Extraktion mit 5 %iger Kaliumhydrogencarbonatlösung den Thioäther V rein zu erhalten. Die ersten Extrakte enthalten hauptsächlich das N,N'-Dicarbobenzoxyl-L-cystin. Dieses ist jedoch auch in den letzten Extrakten noch in geringer Menge mit enthalten.

Gewinnung des Thioäthers V durch präparative Papierelektrophorese:

Das Rohprodukt wird in der auf das 20fache verdünnten Pufferlösung vom pH 6,5 gelöst. Es ist darin sehr schwer löslich. Man verfährt daher besser so, dass man das Rohprodukt in nicht verdünnter Pufferlösung löst und nachträglich mit Wasser auf das 20fache verdünnt. Das gelöste Substanzgemisch wird mit der 'Continuous Flow Paper Elektrophoresis Cell Model CP' der Beckman Spinco Division Instruments Inc. aufgetrennt. Die Fraktionen, die den Thioäther V enthalten, werden im Vakuum eingedampft. Man isoliert ein braun gefärbtes, aber elektrophoretisch reines Produkt.

Ausbeute: 666 mg = 8,4 % d. Th. bezogen auf die insgesamt eingesetzte Tryptophan-Komponente.

17. p-Nitrophenylester des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenz-oxy-L-alanyl-(β))-sulfides (VIa)

333 mg (0,45 mMol) des Thioäthers V und 313 mg (2,25 mMol) p-Nitrophenol werden in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran und 5 ml absolutem Chloroform gelöst, auf -15° gekühlt und mit

einer gekühlten Lösung von 465 mg (2,25 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 5 ml absolutem Chloroform vereinigt. Das Reaktionsgemisch bleibt 1 Stunde in der Tiefkühltruhe, 12 Stunden im Kühlschrank und wird anschliessend 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Man beobachtet die Abscheidung von Dicyclohexylharnstoff. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird er abfiltriert. Die Lösungsmittel werden im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird zur Entfernung des überschüssigen Dicyclohexylcarbodiimids mehrmals mit Petroläther verrieben, danach in Essigester gelöst und mit 5 %iger Kaliumhydrogencarbonatlösung zur Entfernung nicht umgesetzter Ausgangsstoffe ausgeschüttelt. Die neutral gewaschene und getrocknete Essigesterlösung wird in Petroläther eingetropft. Dabei scheidet sich der gelbbraune, schmierige, aber elektrophoretisch einheitliche p-Nitrophenylester VIa ab.

Ausbeute: 196 mg = 51 % d. Th.

18. Thiophenylester des (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbo-benzoxy-L-alanyl-(8))-sulfides (VIb)

Die Darstellung erfolgt mit 333 mg (0,45 mMol) des Thiophenäthers V, 0,23 ml (2,25 mMol) Thiophenol und 465 mg (2,25 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in der unter 17. beschriebenen

Weise.

Der gewonnene Thiophenylester VIb fällt in gelbbraunen Flocken an und ist elektrophoretisch einheitlich.

Ausbeute: 184 mg = 49 % d. Th.

19. p-Nitrophenylester des (L-Alanyl-L-prolyl-L-tryptophan-
methylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-
sulfides (VIIa)

196 mg (0,23 mMol) der Verbindung VIa werden mit 5 ml Tri-
fluoressigsäure übergossen. Man lässt 2 Stunden bei Raum-
temperatur reagieren und destilliert dann die Trifluoressig-
säure im Vakuum ab. Der braune ölige Rückstand wird mit
Äther übergossen. Nach längerem Reiben bilden sich aus dem
Öl bräunliche Flocken. Das Produkt zeigt im Elektrophero-
gramm bei pH 1,9 ausser Spuren nicht umgesetzten Ausgangs-
stoffes zwei Nebenprodukte.

Ausbeute: 127 mg unreines Rohprodukt.

Zur Reinigung durch präparative Papierelektrophorese wird
die Substanz in 3 ml Tetrahydrofuran gelöst und auf 2 Bogen

aufgetragen. Die Elektrophorese wird 4 Stunden im Puffer vom pH 1,9 bei einer Feldstärke von 50 V/cm durchgeführt. Zur Lokalisierung der Stoffe wird ein schmaler Streifen des Bogens mit Ninhydrin entwickelt. Der Teil des Bogens mit stärkster Ninhydrin-Reaktion wird herausgeschnitten und die Substanz mit Isopropanol eluiert.

20. Thiophenylester des (L-Alanyl-L-prolyl-L-tryptophan-methylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxyl-L-alanyl-(β))-sulfides (VIIb)

184 mg (0,22 mMol) der Verbindung VIb werden behandelt, wie es unter 19. beschrieben worden ist. Das Elektropherogramm ergibt das gleiche Bild.

Ausbeute: 106 mg unreines Rohprodukt.

Die Reinigung erfolgt in der gleichen Weise.

21. tert.-Butyloxy-carbonyl-L-alanin-hydroxyphthalimidester und seine Behandlung mit Trifluoressigsäure (33)

Die auf -15° gekühlten Lösungen von 946 mg (5 mMol) tert.-

Butyloxycarbonyl-L-alanin und 816 mg (5 mMol) N-Hydroxyphthalimid in einem Gemisch aus 25 ml absolutem Tetrahydrofuran und 10 ml absolutem Methylenchlorid und von 1,135 g (5,5 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 10 ml absolutem Methylenchlorid werden vereinigt. Man lässt 1 Stunde in der Tiefkühltruhe, 1 Tag im Eisschrank und 1 Tag bei Raumtemperatur reagieren. Danach saugt man den abgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff ab, destilliert die Lösungsmittel im Vakuum ab und behandelt den Rückstand zur Auflösung nicht umgesetzten Dicyclohexylcarbodiimids mit Petroläther. Das Rohprodukt wird in Essigester aufgenommen und mit 5 %iger Kaliumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt, um nicht umgesetztes tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanin zu entfernen, das im Rohprodukt elektrophoretisch nachweisbar ist. Dabei ist die wässrige Phase durch das Anion des N-Hydroxyphthalimids stets gelb gefärbt. Nach mehreren Extraktionen wird die Essigesterlösung neutral gewaschen und getrocknet. Man gewinnt aus ihr ein elektrophoretisch reines Produkt, das aus Essigester/Petroläther nicht in kristalliner Form erhalten wird.

Bei der Behandlung des tert.-Butyloxycarbonyl-L-alaninhydroxyphthalimidesters mit Trifluoressigsäure färbt sich die Lösung braun. Nach 2 Stunden wird die Trifluoressigsäure abdestilliert und der ölige Rückstand mit Äther

übergossen. Durch Verreiben erhält man ein braunes festes Produkt, dessen Hauptbestandteil durch Elektrophorese bei pH 1,9 mit L-Alanin identifiziert werden konnte.

22. Carbobenzoxy-glycyl-DL-valyl-DL-alaninmethylester

Die Darstellung erfolgt nach der unter 3. ausführlich beschriebenen Anhydrid-Methode mit 9,25 g (0,03 Mol) Carbobenzoxy-glycyl-DL-valin und 4,20 g (0,03 Mol) DL-Alaninmethylester. Bei der Aufarbeitung lässt sich das Carbobenzoxy-dipeptid nur schwer mit Kaliumhydrogencarbonatlösung extrahieren. Eine quantitative Extraktion ist jedoch nicht erforderlich, da es bei Kristallisation des öligen Rohproduktes mit Essigester/Petroläther vollständig in der Lösung bleibt.

Ausbeute: 8,0 g = 68 % d. Th., Fp: 126° - 128°

23. Glycyl-DL-valyl-DL-alaninmethylester-hydrochlorid

7,85 g (0,02 Mol) Carbobenzoxy-glycyl-DL-valyl-DL-alaninmethylester werden in 30 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von Pd-Katalysator und 20 ml 3 n methanolischer Salzsäure

wird bei 40° unter Rühren Wasserstoff durch die Lösung geleitet, bis der abgeleitete Gasstrom eine Bariumhydroxidlösung durch das entstandene Kohlendioxid nicht mehr trübt. Dann wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der ölige Rückstand wird in absolutem Methanol gelöst und bis zur Trübung mit absolutem Äther versetzt. Die abgeschiedenen Kristalle sind elektrophoretisch rein.

Ausbeute: 5,16 g = 88 % d. Th.

24. Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alaninmethylester

Die Darstellung erfolgt nach der unter 3. ausführlich beschriebenen Anhydrid-Methode mit 7,30 g (17,5 mMol) Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl-L-alanin und 5,16 g (17,5 mMol) Glycyl-DL-valyl-DL-alaninmethylester-hydrochlorid. Das Produkt fällt während der Synthese aus, da es in Tetrahydrofuran schwer löslich ist. Eine normale Aufarbeitung ist wegen der geringen Löslichkeit des Produktes in Essigester nicht möglich. Nachdem das Tetrahydrofuran abdestilliert worden ist, wird der Rückstand gleichzeitig mit Essigester und Wasser durchgeschüttelt. Dabei gehen die nicht umgesetzten Ausgangskomponenten alle in Lösung und man erhält das

elektrophoretisch reine geschützte Pentapeptid.

Ausbeute: 9,04 g = 78 % d. Th., Fp: 188° - 192°

25. S-Benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alanin-
methylester-hydrobromid

3,29 g (5 mMol) Carbobenzoxy-S-benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alaninmethylester werden mit 5 ml einer 20 %igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig übergossen. Es entsteht allmählich eine klare Lösung. Nach 2 Stunden wird absoluter Äther zugefügt und die Substanz durch Reiben zur Kristallisation gebracht. Durch wiederholtes Waschen mit Äther wird das Produkt von restlichem Bromwasserstoff und Eisessig befreit. Es ist elektrophoretisch rein.

Ausbeute: 2,91 g = 96 % d. Th.

26. S-Benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alanin

2,91 g (4,8 mMol) S-Benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alaninmethylester-hydrobromid werden in 25 ml Methanol gelöst und mit 9,6 ml 1,1 n Natronlauge zur Ver-

seifung bei Raumtemperatur 2 Tage stehen gelassen. Die Lösung wird mit 2 n Salzsäure neutralisiert und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird bei 40° in absolutem Methanol aufgenommen, die Lösung filtriert und mit absolutem Äther bis zur Trübung versetzt. Es scheidet sich eine gallertartige Masse ab, die im Vakuum getrocknet wird und im Elektropherogramm bei pH 1,9 und pH 6,5 einheitlich ist.

Ausbeute: 2,22 g = 91 % d. Th., Fp: ab 170° Zers.

27. Cyclisierung des S-Benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alanins nach der Anhydrid-Methode

510 mg (1 mMol) des Pentapeptides werden in 80 ml Dimethylformamid gelöst und bei -10° mit 0,096 ml (1 mMol) Chlorameisensäureäthylester versetzt. Nach 30 Minuten werden 0,14 ml (1 mMol) Triäthylamin zugefügt. Nach weiteren 30 Minuten wird das Kältebad entfernt und der Ansatz 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Lösung wird im Vakuum bei 70° eingeengt, vom abgeschiedenen Triäthylammoniumhydrochlorid befreit und mit Wasser bis zur Trübung versetzt. Im Kühlschrank scheidet sich eine amorphe Substanz ab, die in Methanol löslich ist. Im Elektropherogramm bei pH 6,5 ist

eine neutrale und eine saure Verbindung nachweisbar, die beide mit Ninhydrin keine Farbe ergeben und damit das Cyclopeptid und das Urethan darstellen.

28. Cyclisierung des S-Benzyl-L-cysteinyl-L-alanyl-glycyl-DL-valyl-DL-alanins mit Dicyclohexylcarbodiimid

Die auf -15° gekühlten Lösungen von 102 mg (0,2 mMol) Penta-peptid in 10 ml absolutem Dimethylformamid und von 412 mg (2 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 5 ml absolutem Dimethylformamid werden vereinigt. Der Ansatz wird 1 Stunde in der Tiefkühltruhe, 1 Tag im Eisschrank und 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschliessend wird vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel bei 70° im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird mit Petroläther zur Entfernung des überschüssigen Reagenzes behandelt und in Methanol gelöst. Nach Zusatz von Wasser bis zur Trübung scheidet sich eine flockige Substanz ab, die im Elektropherogramm bei pH 6,5 einheitlich ist, am Start liegenbleibt und mit Ninhydrin keine Farbreaktion ergibt.

29. tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolin

11,7 g (0,042 Mol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alaninthiophenyl-

ester in 75 ml Tetrahydrofuran und 5,24 g (0,04 Mol) L-Hydroxyprolin werden nach der unter 9. gegebenen Vorschrift umgesetzt. Bei der Aufarbeitung wird nach dem Ansäuern mit Citronensäure die Lösung mit Natriumchlorid versetzt, um das in Wasser lösliche Produkt abzuscheiden. Die Mutterlauge wird mit Essigester extrahiert. Dabei fällt eine weitere Menge der Verbindung aus. Aus dem Extrakt erhält man eine dritte Fraktion. Die gewonnenen Fraktionen sind elektrophoretisch rein.

Ausbeute: 8,1 g = 67 % d. Th., Fp: 154°

30. tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolyl-L-tryptophanmethylester (IX)

6,05 g (0,02 Mol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolin und 5,10 g (0,02 Mol) L-Tryptophanmethylester-hydrochlorid werden nach dem unter 3. beschriebenen Anhydrid-Verfahren umgesetzt. Bei der Aufarbeitung wird 10 %ige Citronensäure statt 2 n Salzsäure verwendet.

Das Produkt fällt aus Essigester/Petroläther als amorphes Pulver an, das elektrophoretisch rein ist.

Ausbeute: 7,75 g = 77,5 % d. Th., Fp: 110° - 115°

31. (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfid (X)

Die Synthese erfolgt mit dem Tripeptidderivat IX und N-Carbobenzoxy-L-cystein nach dem unter 16. beschriebenen Verfahren. Das Elektropherogramm des Rohproduktes zeigt das gleiche Bild wie im Falle des Thioäthers V.

Wird die Synthese in Gegenwart von Triäthylamin durchgeführt, so wird mit der Tryptophan-Komponente eine dieser äquivalente Menge Base dem Ansatz zugefügt.

Zur Reinigung durch präparative Papierelektrophorese wird das gefällte Rohprodukt in Methanol gelöst. Je Bogen werden nicht mehr als 100 mg aufgetragen, da bei grösseren Mengen keine gute Trennung der Substanzen erreicht wird. Die Elektrophorese wird 4 Stunden im Puffer vom pH 6,5 bei einer Feldstärke von 50 V/cm durchgeführt. Die Verbindung wird mit Methanol eluiert.

Ausbeute:

Ein Ansatz mit 1,13 mMol Tryptophan-Komponente ergab 60 mg des reinen Thioäthers X; das sind 7 % d. Th.

32. L-Tryptophanmethylester-trichloracetat (58)

5,10 g (0,02 Mol) L-Tryptophanmethylester-hydrochlorid werden in 50 ml trockenem Chloroform suspendiert. Unter Eiskühlung wird bis zur Sättigung Ammoniak eingeleitet. Die Lösung wird filtriert und im Vakuum eingedampft. Der ölige freie Ester wird in 20 ml absolutem Äther gelöst und mit einer Lösung von 3,27 g (0,02 Mol) Trichloressigsäure in 20 ml absolutem Äther versetzt. Dabei scheidet sich ein Öl ab, das durch Reiben zur Kristallisation gebracht wird. Die Kristalle werden gut mit absolutem Äther gewaschen.

Ausbeute: 6,0 g = 80 % d. Th., Fp: 121° (Zers.)

33. (L-Tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxyl-
L-alanyl-(β))-sulfid (XII)

Die Synthese wird mit 0,88 g (6,6 mMol) N-Chlorsuccinimid in 18 ml absolutem Chloroform, 1,55 g (6,0 mMol) N-Carbobenzoxyl-L-cystein in 16 ml absolutem Chloroform und 12 ml absolutem Tetrahydrofuran und 1,14 g (3,0 mMol) L-Tryptophanmethylester-trichloracetat in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran nach der unter 16. angegebenen Vorschrift ausge-

führt. Nach einiger Zeit fällt das Produkt aus der Lösung aus. Der Ansatz wird 1 Tag in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Durch Filtration gewinnt man den Thioäther XII nahezu farblos und elektrophoretisch rein.

Ausbeute: 910 mg = 64 % d. Th., Fp: 187° (Zers.)

Aus 11 Ansätzen verschiedener Grösse wurden mit schwankender Ausbeute insgesamt 7,28 g der Verbindung XII erhalten.

34. (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxyl-L-alanyl-(β))-sulfid (X)

Die Darstellung erfolgt mit 302 mg (1 mMol) tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolin in 30 ml absolutem Tetrahydrofuran und 472 mg (1 mMol) (L-Tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxyl-L-alanyl-(β))-sulfid (XII), das mit der äquivalenten Menge Triäthylamin in 30 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst worden ist, nach der unter 3. beschriebenen Anhydrid-Methode. Die Aufarbeitung des Ansatzes wird etwas variiert. Man filtriert vom abgeschiedenen Triäthylammoniumchlorid ab und säuert mit 10 %iger Citronensäure an. Nachdem das Tetrahydrofuran im Vakuum abgezogen

worden ist, extrahiert man die Lösung mit Essigester. Die Ausgangsstoffe bleiben wegen ihrer besseren Löslichkeit in der wässrigen Phase zurück. Der Extrakt enthält nur das gewünschte Reaktionsprodukt. Er wird neutral gewaschen, getrocknet und eingeengt. Durch Zugabe von Petroläther erhält man ein elektrophoretisch reines Produkt, das mit Zimtaldehyd/HCl eine blaue Farbe ergibt.

Ausbeute: 570 mg = 75,5 % d. Th.

Aus 6 Ansätzen verschiedener Grösse wurden mit schwankender Ausbeute insgesamt 2,032 g der Verbindung X erhalten.

35. (L-Alanyl-L-hydroxyprolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfid (XI)

530 mg (0,7 mMol) (tert.-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-L-hydroxyprolyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfid (X) werden mit 15 ml Trifluoressigsäure übergossen. Es entsteht eine rotviolette Lösung. Nach 3 Stunden wird die Trifluoressigsäure im Vakuum abdestilliert und der ölige Rückstand mit absolutem Äther übergossen. Durch Verreiben erhält man eine rotbraune feste Substanz, die durch präparative Papierelektrophorese gereinigt wird. Je 60 mg

werden in 1 ml Methanol gelöst, auf 1 Bogen aufgetragen und im Puffer vom pH 1,9 4 Stunden der Elektrophorese bei einer Feldstärke von 50 V/cm unterzogen. Die Substanz wird mit Methanol eluiert.

Ausbeute:

Aus 1,51 g Rohprodukt erhält man 543 mg reine Substanz; das sind 43 % d. Th.

36. cyclo-(L-Alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfid (VIII)

328 mg (0,5 mMol) (L-Alanyl-L-hydroxypropyl-L-tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxy-L-alanyl-(β))-sulfid (XI) werden in 500 ml destilliertem Äthanol gelöst und mit 10,5 g (150 mMol) Äthoxyacetylen 7 Stunden auf 65° erwärmt. Nachdem der Ansatz noch 12 Stunden bei Raumtemperatur gestanden hat, wird das Lösungsmittel mit dem Überschuss des Reagenzes im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in Methanol gelöst und das cyclische Reaktionsprodukt mit 5 %iger Kaliumhydrogencarbonatlösung und Wasser gefällt. Das saure Nebenprodukt bleibt dabei in Lösung. Der Niederschlag ist elektrophoretisch bei pH 1,9 und pH 6,5 einheitlich. Er zeigt mit Zimtaldehyd/HCl eine blaue Farbe und gibt mit Ninhydrin keine Reaktion.

Bei der Verseifung der Methylestergruppe mit 1 n Natronlauge in Dioxan entstehen aus der Verbindung VIII zwei Stoffe, die im Elektropherogramm bei pH 6,5 zur Anode wandern und mit Zimtaldehyd/HCl und Ninhydrin wie die Verbindung VIII reagieren.

37. S-Benzyl-L-cystein (59)

39,4 g (0,25 Mol) L-Cystein-hydrochlorid werden portionsweise unter Rühren in 600 ml flüssiges Ammoniak gebracht. Anschliessend fügt man 18 g (0,75 Mol) Natrium in kleinen Stücken hinzu, bis die Lösung blau bleibt. Man entfernt die blaue Farbe durch Zusatz von Ammoniumchlorid und lässt 32 ml (0,275 Mol) Benzylchlorid zutropfen. Nachdem das Ammoniak verdunstet ist, wird der Rückstand in 300 ml Wasser gelöst und zur Beseitigung überschüssigen Benzylchlorides mit Äther ausgeschüttelt. Die Lösung wird über Aktivkohle filtriert und auf 1,2 l verdünnt. Beim Ansäuern mit 2 n Salzsäure fällt das Produkt bei pH 5 - 6 elektrophoretisch rein aus. Es wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

Ausbeute: 26,5 g = 50 % d. Th., Fp: 205° - 208°

38. N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystein

18 g (0,085 Mol) S-Benzyl-L-cystein, 4 g (0,1 Mol) Magnesiumoxid und 14,3 g (0,1 Mol) tert.-Butyloxycarbonylazid werden in 110 ml Wasser und 250 ml Dioxan nach der unter 4. beschriebenen Methode umgesetzt. Beim Ansäuern mit Citronensäure fällt das in schwach saurer Lösung unlösliche, nicht umgesetzte S-Benzyl-L-cystein aus.

Man erhält ein elektrophoretisch reines öliges Produkt, das nicht kristallisiert werden kann, aber allmählich erstarrt.

Ausbeute: 19,8 g = 75 % d. Th.

39. N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-cystein

11,2 g (0,036 Mol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cystein werden in 500 ml flüssigem Ammoniak gelöst und portionsweise mit 2,5 g (0,108 Mol) Natrium versetzt, bis die Lösung blau bleibt. Die Farbe wird durch Zusatz von Ammoniumchlorid beseitigt. Man lässt das Ammoniak verdunsten und nimmt den Rückstand in 100 ml Wasser auf. Die milchige Lösung wird beim Ausschütteln mit Essigester zur Entfernung des gebildeten Toluols klar. Man säuert mit 10 %iger Citronen-

säure bis pH 4 an, sättigt die Lösung mit Natriumchlorid und schüttelt das Produkt mit Essigester aus. Aus dem gewaschenen und getrockneten Extrakt erhält man ein elektrophoretisch reines öliges Produkt. Die Aufarbeitung muss schnell und möglichst unter Stickstoff erfolgen, da sonst ein Teil der Verbindung zum Cystinderivat oxydiert wird.

Ausbeute: 6,7 g = 84 % d. Th.

40. N,N'-Di-trifluoracetyl-L-cystin (40)

7,2 g (0,03 Mol) L-Cystin werden in 75 ml siedender Trifluoressigsäure gelöst. Bei -10° lässt man innerhalb von 30 Minuten 10,5 ml (0,036 Mol) Trifluoressigsäureanhydrid zutropfen. Nachdem der Ansatz noch 1 Stunde bei Raumtemperatur gestanden hat, wird die Trifluoressigsäure im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird mit 200 ml absolutem Äther ausgekocht. Spuren von L-Cystin und Monotrifluoracetyl-L-cystin bleiben ungelöst und werden abfiltriert. Der Äther wird abgezogen und der elektrophoretisch reine Rückstand aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 6,0 g = 46 % d. Th., Fp: 167°

41. N-Trifluoracetyl-L-cystein

Die Reduktion des N,N'-Di-trifluoracetyl-L-cystins erfolgt nach dem unter 14. beschriebenen Verfahren mit 864 mg (2 mMol) Substanz . Das elektrophoretisch einheitliche Produkt ist ölig.

Ausbeute: 542 mg = 62,5 % d. Th.

42. (L-Tryptophyl-(ind-2))-(carbobenzoxyl-L-alanyl-(8))-sulfid

471,5 mg (1 mMol) (L-Tryptophanmethylester-yl-(ind-2))-(carbobenzoxyl-L-alanyl-(8))-sulfid (XII) werden in 15 ml Methanol und 10 ml Wasser mit 2,2 ml 1 n Natronlauge gelöst. Der Ansatz bleibt 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen und wird dann mit 2 n Salzsäure angesäuert. Dabei scheidet sich das Produkt schwach braun gefärbt und amorph, aber elektrophoretisch einheitlich ab. Eine weitere Fraktion fällt aus, nachdem das Methanol im Vakuum abdestilliert worden ist.

Ausbeute: 352 mg = 77 % d. Th.

43. L-Tryptophyl-(ind-2)-L-alanyl-(β)-sulfid (II)

(Tryptathionin)

107 mg (0,33 mMol) (L-Tryptophyl-(ind-2))-(carbobenzoxyl-L-alanyl-(β))-sulfid werden in 1,6 ml absolutem Eisessig mit 0,8 ml einer 36,7 %igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig 3 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann mit absolutem Äther versetzt. Es scheidet sich ein rotbraunes Öl ab, das durch längeres Verreiben mit mehrmals erneuertem Äther in eine schwach braun gefärbte feste Masse übergeführt wird.

Zur Reinigung durch präparative Papierelektrophorese bei pH 1,9 wird das Rohprodukt in 3 ml Pufferlösung vom pH 1,9 gelöst und auf 2 Bogen aufgetragen. Die Elektrophorese wird 4 Stunden bei einer Feldstärke von 50 V/cm durchgeführt. Das gereinigte Tryptathionin wird mit Wasser eluiert und mit Äthanol gefällt. Die Analyse zeigt, dass das Tryptathionin dabei teilweise als Monoformiat-monohydrat und teilweise als Monoacetat-monohydrat anfällt.

Ausbeute:

32,6 mg = 43 % d. Th. (bezogen auf freies Tryptathionin)

Fp: ab 200° Zers.

Analyse:

Tryptathionin-monoformiat-monohydrat:

$C_{14}H_{17}N_3O_4S \cdot HCO_2H \cdot H_2O$	berechnet:
MG: 387,35	46,51 % C
	5,46 % H
	10,85 % N
	8,26 % S

Tryptathionin-monoacetat-monohydrat:

$C_{14}H_{17}N_3O_4S \cdot CH_3CO_2H \cdot H_2O$	berechnet:
MG: 401,37	47,88 % C
	5,78 % H
	10,47 % N
	7,98 % S

gefunden: 47,54 % C

5,54 % H

10,73 % N

8,36 % S

R_f -Wert: 0,68 im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G

mit Methanol : Wasser = 1 : 1

$[\alpha]_D^{24} = + 24^\circ \pm 1^\circ$ in Wasser

44. L-Cysteinmethylester-hydrochlorid

a) Darstellung mit Methanol und Chlorwasserstoff (60):

15,8 g (0,1 Mol) L-Cystein-hydrochlorid werden nach der unter 2. a) beschriebenen Methode umgesetzt.

Ausbeute:

1. Fraktion:

12,0 g = 70 % d. Th., Fp: 140°, SH-Gehalt: 100 %

2. Fraktion:

3,9 g = 23 % d. Th., Fp: 130°, SH-Gehalt: 88 %

b) Darstellung mit Methanol und Thionylchlorid:

15,8 g (0,1 Mol) L-Cystein-hydrochlorid werden nach dem unter 2. b) beschriebenen Verfahren umgesetzt.

Ausbeute:

9,8 g = 57 % d. Th., Fp: 135°, SH-Gehalt: 90,5 %

45. L-Cysteinmethylester-trichloracetat

5,15 g (0,03 Mol) L-Cysteinmethylester-hydrochlorid werden

in der unter 32. beschriebenen Weise in das Trichloracetat übergeführt.

Ausbeute: 7,5 g = 84 % d. Th., Fp: 70° - 80° , SH-Gehalt: 86 %

46. Bestimmung des SH-Gehaltes von L-Cysteinmethylester (61)

Der Gehalt an SH-Gruppen im L-Cysteinmethylester-hydrochlorid und -trichloracetat wird durch jodometrische Titration ermittelt. Die Substanz wird in 70 - 90 %iger Essigsäure gelöst und mit einem Überschuss von n/10 $\text{KJ} \cdot \text{J}_2$ -Lösung versetzt; nach 1 Minute wird mit n/10 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zurücktitriert.

47. Thioäthersynthese mit L-Cystin-Derivaten und Zusatz von Lithiumchlorid

Die Versuche werden in der gleichen Weise ausgeführt, wie es unter 16. beschrieben ist. Man suspendiert 147 mg (1,1 mMol) N-Chlorsuccinimid und 46,6 mg (1,1 mMol) Lithiumchlorid in 3 ml absolutem Chloroform und 2 ml absolutem Tetrahydrofuran. 509 mg (1 mMol) N,N'-Dicarbobenzoxy-L-cystin beziehungsweise 392 mg (1 mMol) N,N'-Di-tert.-butyloxycarbonyl-L-cystin werden in 5 ml absolutem Chloroform und 4 ml absolutem Tetrahydro-

furan gelöst und zugetropft. 382 mg (1 mMol) L-Tryptophanmethylester-trichloracetat in 6 ml absolutem Tetrahydrofuran werden dann zugegossen.

48. Carbobenzoxy-L-tryptophanmethylester

Die Verbindung wird nach einem von Herrn Dr. H. DETERMANN, Frankfurt am Main, mitgeteilten Verfahren dargestellt.

1,91 g (5 mMol) L-Tryptophanmethylester-trichloracetat werden in 50 ml absolutem Chloroform suspendiert und im Eisbad unter Rühren mit 0,7 ml (5 mMol) Triäthylamin versetzt. Dann lässt man nacheinander 0,71 ml (5 mMol) Carbobenzoxychlorid und 0,7 ml (5 mMol) Triäthylamin zutropfen. Der Ansatz wird nach 1 Stunde aus dem Eisbad entfernt, und nach einer weiteren Stunde wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in Essigester gelöst und mit 2 n Salzsäure durchgeschüttelt. Die Essigesterlösung wird neutral gewaschen und getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhält man das elektrophoretisch reine Produkt als Öl.

Ausbeute: 1,25 g = 71 % d. Th.

49. N-Carbobenzoxy-L-cysteinmethylester

860 mg (5 mMol) werden in 40 ml absolutem Chloroform in gleicher Weise wie unter 48. beschrieben umgesetzt. Man erhält ein öliges Produkt, das elektrophoretisch rein ist.

Ausbeute: 855 mg = 64 % d. Th.

50. Thioäthersynthesen mit Dirhodan

900 mg (2,8 mMol) Bleirhodanid werden in 5 ml des verwendeten Lösungsmittels (Äther, Tetrahydrofuran oder Dimethylformamid) suspendiert. Bei 0° lässt man 0,153 ml (2,8 mMol) Brom in 5 ml Lösungsmittel zutropfen. Wenn die Farbe des Broms verschwunden ist, filtriert man die schwach gelb gefärbte Lösung des Dirhodans.

Zu dieser Lösung lässt man bei 0° unter Stickstoff 1,4 mMol der L-Cystein-Komponente in 5 ml Lösungsmittel zutropfen. Anschliessend werden 1,4 mMol der L-Tryptophan-Komponente in 5 ml Lösungsmittel zugefügt. Die Reaktionsprodukte werden mit absolutem Äther gefällt.

Literaturverzeichnis

- (1) H. A. RAAB,
Z. physiol. Chem. 207, 157 (1932)
- (2) H. A. RAAB u. J. RENZ,
Z. physiol. Chem. 216, 224 (1933)
- (3) J. RENZ,
Z. physiol. Chem. 230, 245 (1934)
- (4) F. LYNEN u. U. WIELAND,
Liebigs Ann. Chem. 532, 93 (1938)
- (5) H. WIELAND u. B. WITKOP,
Liebigs Ann. Chem. 543, 171 (1940)
- (6) TH. WIELAND u. W. SCHÖN,
Liebigs Ann. Chem. 592, 157 (1955)
- (7) TH. WIELAND u. A. SCHÖPF,
Liebigs Ann. Chem. 626, 174 (1959)
- (8) TH. WIELAND u. H. W. SCHNABEL,
Liebigs Ann. Chem. 657, 225 (1962)
- (9) TH. WIELAND u. K. MANNES,
Angew. Chem. 69, 389 (1957)
- (10) TH. WIELAND u. K. MANNES,
Liebigs Ann. Chem. 617, 152 (1958)
- (11) TH. WIELAND,
Helv. Chim. Acta 44, 919 (1961)
- (12) TH. WIELAND, K. FRETER u. E. GROSS,
Liebigs Ann. Chem. 626, 154 (1959)
- (13) G. SCHUPFNER,
Dissertation Frankfurt/M 1960
- (14) TH. WIELAND u. R. SARGES,
Liebigs Ann. Chem. 658, 181 (1962)
- (15)a) TH. WIELAND u. H. BERNHARD,
Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1952)
b) R. A. BOISSONNAS,
Helv. Chim. Acta 34, 874 (1951)

- c) J. R. VAUGHAM jr.,
J. Amer. Chem. Soc. 73, 3547 (1951)
- (16) F. C. McKAY u. N. F. ALBERTSON,
J. Amer. Chem. Soc. 79, 4686 (1957)
- (17) G. W. ANDERSON u. A. C. MCGREGOR,
J. Amer. Chem. Soc. 79, 6180 (1957)
- (18) R. SCHWYZER, P. SIEBER u. H. KEPPELER,
Helv. Chim. Acta 42, 2622 (1959)
- (19) L. A. CARPINO, C. A. GIZA u. B. A. CARPINO,
J. Amer. Chem. Soc. 81, 955 (1959)
- (20) H. KAPPELER u. R. SCHWYZER,
Helv. Chim. Acta 43, 1453 (1960)
- (21)a) L. A. CARPINO,
J. Amer. Chem. Soc. 79, 98 (1957)
b) L. A. CARPINO,
J. Amer. Chem. Soc. 79, 4427 (1957)
- (22) M. BRENNER u. W. HUBER,
Helv. Chim. Acta 36, 1109 (1953)
- (23) TH. WIELAND u. B. HEINKE,
Liebigs Ann. Chem. 615, 184 (1958)
- (24) TH. WIELAND, W. SCHÄFER u. E. BOKELMANN,
Liebigs Ann. Chem. 573, 99 (1951)
- (25) TH. WIELAND, O. WEIBERG, E. FISCHER u. G. HÖRLEIN,
Liebigs Ann. Chem. 587, 146 (1954)
- (26) TH. WIELAND, O. WEIBERG u. W. DILGER,
Liebigs Ann. Chem. 592, 69 (1955)
- (27) H. EMDE,
Dtsch. Bundespat. 804 572 vom 26. 4. 1951
(C. A. 46, 529 (1952))
- (28) TH. WIELAND, E. BOKELMANN, L. BAUER, H. U. LANG u. H. LAU,
Liebigs Ann. Chem. 583, 129 (1953)
- (29) M. BERGMANN u. L. ZERVAS,
Ber. dtsh. chem. Ges. 65, 1192 (1932)
- (30) R. SCHWYZER u. P. SIEBER,
Angew. Chem. 68, 518 (1956)

- (31) J. C. SHEEHAN u. J. P. HESS,
J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067 (1955)
- (32) R. SARGES,
Dissertation Frankfurt / M 1962
- (33) G. H. L. NEFKENS u. G. J. TESSER,
J. Amer. Chem. Soc. 83, 1263 (1961)
- (34) D. BEN-ISHAI u. A. BERGER,
J. org. Chem. 17, 1564 (1952)
- (35) R. A. BOISSONNAS u. I. SCHUMANN,
Helv. Chim. Acta 35, 2229 (1952)
- (36) TH. WIELAND u. K. W. OHLY,
Liebigs Ann. Chem. 605, 179 (1957)
- (37) K. VOGLER, R. O. STUDER, W. LERGIER u. P. LANZ,
Helv. Chim. Acta 43, 1751 (1960)
- (38) J. F. ARENS,
Rec. 74, 769 (1955)
- (39) E. A. MOROZOVA u. S. M. ZHENODAROVA,
J. allg. Chem. (russ.) 31, 45 (1961)
(Angew. Chem. 73, 303 (1961) u. C. A. 55, 27121 (1961))
- (40) F. WEYGAND u. R. GEIGER,
Chem. Ber. 89, 647 (1956)
- (41) F. WEYGAND u. E. CSENDES,
Angew. Chem. 64, 136 (1952)
- (42) F. WEYGAND u. W. STEGLICH,
Z. f. Naturf. 14b, 472 (1959)
- (43) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, R. L. HUGUENIN,
P.-A. JAQUENOUD u. E. SANDRIN,
Helv. Chim. Acta 41, 1867 (1958)
- (44) R. G. HISKEY, F. J. CARROLL, R. M. BABB, J. O. BLEDSOE,
R. T. PUCKETT u. B. W. ROBERTS,
J. org. Chem. 26, 1152 (1961)
- (45) E. BAUMANN,
Z. physiol. Chem. 8, 299 (1883/84)
- (46) O. WARBURG,
Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten (1948),
S. 38

- (47) R. G. HISKEY u. W. P. TUCKER,
J. Amer. Chem. Soc. 84, 4789 (1962)
- (48) J. L. WOOD,
Org. Reactions 3, 240 (1946)
- (49) TH. WIELAND u. L. BAUER,
Angew. Chem. 63, 511 (1951)
- (50) TH. WIELAND u. K. DOSE,
Angew. Chem. 66, 781 (1954)
- (51) F. REINDEL u. W. HOPPE,
Chem. Ber. 87, 1103 (1954)
- (52) A. BERGER, J. KURTZ u. E. KATCHALSKI,
J. Amer. Chem. Soc. 76, 5552 (1954)
- (53) E. ABDERHALDEN u. M. KEMPE,
Z. physiol. Chem. 52, 207 (1907)
- (54) B. F. ERLANGER, H. SACHS u. E. BRAND,
J. Amer. Chem. Soc. 76, 1806 (1954)
- (55) H. N. RYDON u. P. W. G. SMITH,
Chem. Soc. 1956, 3642
- (56) A. BERGER, J. NOGUCHI u. E. KATCHALSKI,
J. Amer. Chem. Soc. 78, 4483 (1956)
- (57) C. H. HARRINGTON u. T. H. MEAD,
Biochem. J. 30, 1603 (1936)
- (58) G. HILLMANN,
Z. f. Naturf. 1, 682 (1946)
- (59) B. HEGEDÜS,
Helv. Chim. Acta 31, 737 (1948)
- (60) M. BERGMANN u. G. MICHALIS,
Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 987 (1930)
- (61) HOUBEN-WEYL,
Methoden der org. Chemie, 4. Aufl. (1953), Bd. 2, S. 580

L e b e n s l a u f

Am 28. März 1934 wurde ich in Homberg (Bez. Kassel) als Sohn des 1956 verstorbenen Taubstummenoberlehrers Willi SCHMIDT und seiner Ehefrau Minna, geb. WEBER, geboren.

Schulbildung:

März 1940 - Februar 1944:

Holzhausen-Schule in Frankfurt am Main

Februar 1944 - Herbst 1944:

Volksschule in Waldmichelbach im Odenwald

Herbst 1944 - Oktober 1946:

Realgymnasium in Waldmichelbach im Odenwald

Oktober 1946 - März 1954:

August-Vilmar-Schule (Realgymnasium) in Homberg (Bez. Kassel);

Tag der Reifeprüfung: 18. März 1954

Studiengang:

Ab Sommersemester 1954 Studium der Chemie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt am Main.

Diplomchemiker-Vorprüfung am 31. Mai 1957 bestanden.

Diplomchemiker-Hauptprüfung am 21. April 1960 bestanden.

Diplomarbeit unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Theodor WIELAND über das Thema "Über die Anwendbarkeit der Phosphoroxychlorid-Methode zur Synthese von Oligopeptiden".

